

## CAPÍTULO 5

# MODELO MATEMÁTICO DE LA COAGULACIÓN EN LA INTERFASE HUESO IMPLANTE - DENTAL

### 5.1. Introducción

Con la oseointegración finaliza una serie de procesos biológicos de recuperación tisular iniciados con la lesión causada durante el procedimiento quirúrgico de inserción del implante. Esta lesión está condicionada al tipo de protocolo de inserción utilizado que típicamente consta de cuatro etapas [4]. En la primera, se retira la encía que cubre el hueso mandibular de la zona donde se ha de colocar el implante. En la segunda, se perfora el sitio de inserción en el hueso expuesto. En la tercera se inserta el implante en el hueso y en la cuarta se cubre el implante con la encía retirada lo que permite una recuperación inicial tanto del hueso como de los demás tejidos lesionados [4,55]. Aunque en la práctica odontológica se prefiere el uso de técnicas que minimizan el área de la lesión y que garantizan la viabilidad del tejido circundante al sitio de inserción, la presencia de sangrado es inevitable durante el procedimiento quirúrgico. El sangrado es la respuesta biológica inicial a la lesión y concluye con la formación del un tapón o coágulo que detiene el flujo de sangre. La posterior degradación de este coágulo permite la recuperación de las estructuras vasculares y la formación de una nueva red fibrilar de tejido conectivo primario denominado tejido granular sobre la que se deposita una nueva matriz extracelular que con el tiempo adquiere la estructura funcional del nuevo hueso y que permite la oseointegración del implante dental [24, 38]. De esta manera, la formación del coágulo

corresponde no sólo al bloqueo de la pérdida de sangre a causa de la lesión sino a la formación de la estructura sobre la cual se inician los procesos de recuperación tisular que culminan con la recuperación ósea [15].

A pesar que gran parte del conocimiento relacionado con el proceso de coagulación proviene de modelos experimentales [134], los modelos matemáticos y las simulaciones computacionales proporcionan información adicional sobre la interacción proteica, celular y tisular que tiene lugar [110, 135]. En general, los modelos matemáticos de coagulación son de tres tipos: los modelos celulares, los modelos bioquímicos y los modelos de tiempo de coagulación [109, 135, 136]. Los modelos celulares describen la actividad celular asociada a la coagulación y la relación que existe entre la señalización bioquímica y los receptores del citoplasma celular [135, 137]. En estos modelos el objetivo es obtener información sobre las concentraciones celulares que participan en la coagulación, y su influencia en la adecuada formación del coágulo respecto a las superficies celulares y extracelulares de contacto [109]. Por su parte, los modelos bioquímicos se basan en la descripción de la compleja cadena de señales bioquímicas que conducen a la formación del coágulo. Aunque estos modelos son soportados por evidencia experimental de la vía de coagulación, no permiten obtener información adicional sobre condiciones patológicas, la mayoría de las veces asociadas a desordenes de la actividad de celular [136, 138]. A partir de esta desventaja surgen los modelos de tiempo de coagulación, en los que como su nombre lo indica se analiza el tiempo que tarda la formación del coágulo y el equilibrio que debe existir entre células y proteínas procoagulantes [110]. En particular, este tipo de modelos proporciona información de la formación, crecimiento y posterior degradación del coágulo bajo situaciones hemostáticas normales así como en casos de desórdenes hemostáticos [110, 135, 139].

Aunque el interés por estos modelos es incuestionable, en la mayoría de ellos el problema de la coagulación es tratado como un fenómeno biológico que es necesario simplificar dada la compleja cadena de eventos bioquímicos asociada. Adicionalmente, estos modelos carecen de una aplicación específica y por lo tanto no pueden ser utilizados directamente como herramienta de diagnóstico en un caso médico concreto. En este capítulo se presenta el desarrollo de un modelo matemático de la coagulación que adopta características de cada uno de los tres grupos de modelos mencionados y que además trata el problema de la coagulación en una aplicación específica, en este caso, la interfase hueso-implante dental. A diferencia de otros modelos [111, 136], nuestro enfoque de la coagulación se centra en las reacciones cinéticas de

la denominada vía común de la coagulación y en la influencia de las plaquetas y del tiempo de coagulación en la consolidación de la cicatrización inicial de la interfase hueso-implante dental. Con la solución del modelo en esta interfase se busca que los resultados sean aplicables a un caso médico concreto, en este caso, la formación del coágulo que inicia la serie de eventos que finaliza en la adecuada oseointegración del implante dental [15, 24].

Para validar el modelo se siguieron dos estrategias. En primer lugar se realizaron simulaciones computacionales utilizando el método de los elementos finitos de las que se obtuvieron resultados que concuerdan cualitativamente con resultados experimentales, a nivel tanto espacial como temporal. Adicionalmente se realizaron dos modificaciones al modelo para evaluar su comportamiento ante condiciones patológicas específicas, de las cuales de nuevo se obtuvieron resultados que concuerdan con el caso experimental. En la siguiente sección se describe el proceso biológico de la coagulación y el modelo matemático propuesto. Luego se realiza la descripción de la simulación, los casos analizados y los resultados obtenidos. Finalmente se presenta la discusión de las limitaciones del modelo y las aplicaciones futuras.

## 5.2. Materiales y Métodos

### 5.2.1. Proceso Biológico de la Coagulación

La coagulación es un proceso que hace parte del mecanismo de hemostasis encargado de proteger la integridad del sistema vascular luego de una lesión [68]. En general, la recuperación vascular consta de tres etapas. Cuando un capilar es lesionado, la sangre entra en contacto con el tejido subendotelial rico en colágeno [70]. Esto activa la cadena bioquímica de moléculas presentes en el plasma sanguíneo conocidas como factores de coagulación que concluye con la coagulación de la sangre [70, 134]. Al mismo tiempo, las plaquetas transportadas por la sangre infiltrada se agrupan y forman un tapón inicial y el capilar lesionado se contrae (figura 5.1) [68, 70]. La acción conjunta de estos procesos crea el tapón final que detiene la pérdida de sangre y recupera la integridad del sistema vascular en la zona de la lesión [15, 68].

El sangrado contiene glóbulos rojos, leucocitos y plaquetas [24]. Aunque los glóbulos rojos están más orientados al transporte de oxígeno, son los leucocitos y las plaquetas las encargadas de iniciar el proceso de cicatrización [15, 24]. Los leucocitos o glóbulos blancos son los

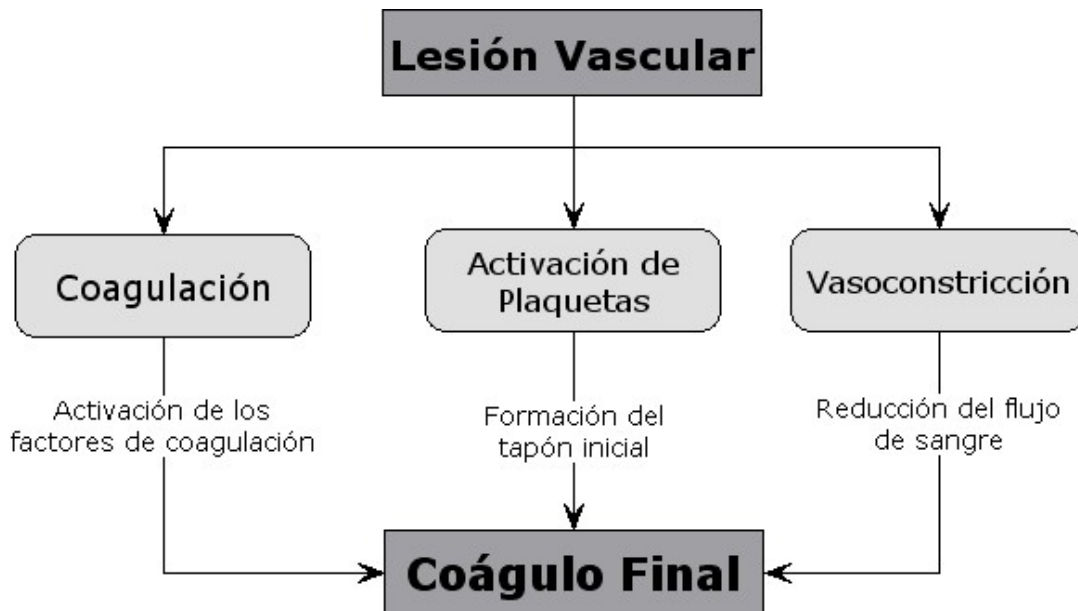


Figura 5.1: La respuesta biológica ante una lesión vascular que termina con la formación del coágulo final comprende tres etapas simultáneas, a saber: 1) Coagulación y activación de los factores de coagulación, 2) Activación de las plaquetas y formación del tapón inicial, y 3) Vasoconstricción que causa la disminución de la pérdida de sangre.

encargados de iniciar la respuesta inmunológica, mientras que las plaquetas se encargan de detener el flujo de sangre al liberar una serie de gránulos [68]. Estos gránulos contienen varias moléculas que gobiernan la actividad inicial en la zona de la lesión entre las que se destaca el fibrinógeno, una proteína que también está presente en el plasma sanguíneo [70, 71].

La cadena de reacciones que permite la coagulación de la sangre es aún motivo de estudio [111]. Sin embargo, se han logrado determinar dos vías que conducen a la formación del coágulo. La primera es la *vía intrínseca*, activada cuando la sangre transportada por el sistema vascular entra en contacto con otras superficies como el ambiente subendotelial rico en colágeno o algunas superficies negativamente cargadas como el vidrio [70, 111]. La segunda vía de coagulación o *vía extrínseca* es activada por la presencia de una lesión vascular que induce una respuesta bioquímica desde los tejidos dañados [15, 70]. Se ha determinado que estas dos vías se combinan en una *vía común* que conduce a la producción de trombina a partir de su precursor, la *protrombina* [68, 140]. La protrombina es una proteína presente en el plasma sanguíneo que es transformada en *trombina* por acción de los factores de coagulación. La función

de la trombina es convertir el fibrinógeno presente en la sangre infiltrada en monómeros de una nueva proteína denominada *fibrina* (figura 5.2). Los monómeros de fibrina se agregan en fibras entrecruzadas que crean una red tridimensional que detiene completamente el flujo de sangre y que además protege los tejidos dejados al descubierto tras la inserción del implante [15]. Esta red de fibras conforma el denominado *coágulo de fibrina* o coágulo final [70,71].

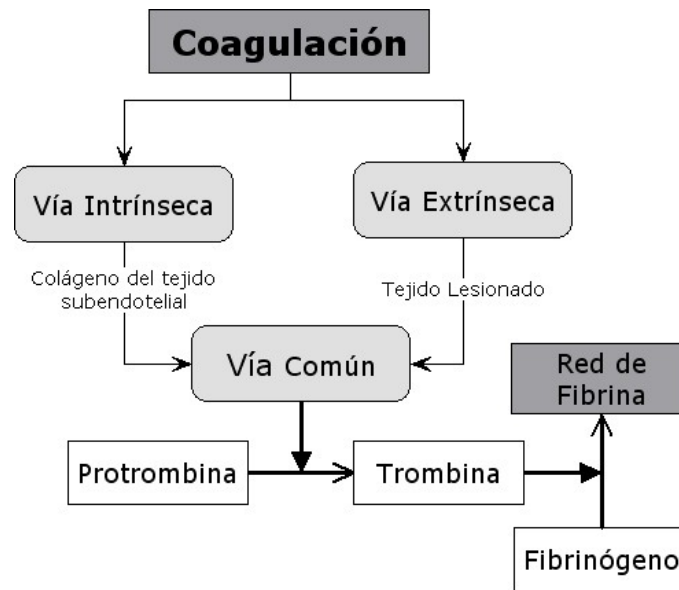
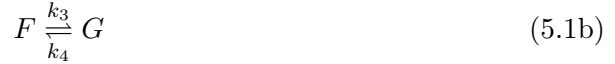


Figura 5.2: La coagulación puede activarse por acción del tejido subendotelial (vía intrínseca) o por acción del tejido lesionado (vía extrínseca). Ambos tipos de activación conducen a una vía común en la que la protrombina es convertida en trombina, que a su vez convierte el fibrinógeno presente en la sangre infiltrada en la red de fibrina que compone el coágulo final.

### 5.2.2. Modelo Matemático

Aunque el proceso de coagulación comprende una compleja cadena de eventos celulares y moleculares, la formación del coágulo de fibrina puede verse fundamentalmente como la conversión de trombina en fibrina [70]. Ya que ambas sustancias se encuentran en la sangre, puede suponerse que la conversión se inicia una vez que se detiene el flujo de sangre en la zona de la lesión, es decir, después de la activación y agregación de las plaquetas y una vez que los factores de coagulación activan la vía común (figura 5.2) [68, 70]. Un mecanismo de

conversión de este tipo puede entenderse como una reacción cinética entre dos sustancias, a saber, trombina y fibrinógeno, donde la primera sustancia es el agente activador y la segunda sustancia el agente de conversión [121,125]. Este tipo de reacción cinética se expresa utilizando la *Ley de acción de masas* de la siguiente manera [117]:



En la ecuación (5.1),  $T$  es la concentración de trombina,  $F$  es la concentración de fibrinógeno,  $P$  es la concentración de protrombina y  $G$  es la concentración de gránulos liberados por las plaquetas. De acuerdo a la Ley de acción de masas, al duplicar la concentración de una de las sustancias de entrada se duplica la tasa de colisión entre las moléculas, lo que a su vez aumenta al doble la concentración de los productos de la reacción [117]. De la ecuación (5.1) se observa que la trombina se forma a partir de la protrombina, mientras que el fibrinógeno se considera como un subproducto de los gránulos liberados por las plaquetas [72]. La ecuación (5.1a) establece que la protrombina es el precursor de la trombina, la ecuación (5.1b) indica que el fibrinógeno proviene de los gránulos liberados por las plaquetas, y las ecuaciones (5.1c) y (5.1d) establecen que la trombina inicia el proceso de conversión. A partir de la ecuación (5.1) se obtiene el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales:

$$\frac{\partial[T]}{\partial t} = D_T \nabla^2 [T] + k_1 [P] - k_2 [T] - k_6 [T][F]^2 \quad (5.2a)$$

$$\frac{\partial[F]}{\partial t} = D_F \nabla^2 [F] + k_4 [G] + k_5 [T] + k_6 [T][F]^2 - k_3 [F] \quad (5.2b)$$

En la ecuación (5.2) las expresiones dadas por (5.1) son complementadas con un término de transporte que tiene en cuenta la difusión tanto de trombina como de fibrinógeno. De esta manera, es posible analizar el cambio en la concentración de estas sustancias en el tiempo

como un proceso difusivo que depende de los términos de formación y degradación contenidos en la ley de acción de masas. La reacción cinética dada por (5.2) es complementada con una tercera expresión que describe explícitamente la formación de fibrina y que está dada por la siguiente ecuación:

$$\frac{\partial f}{\partial t} = \left[ \frac{\alpha f_{max}(1 - \exp(-\alpha t - \beta f))}{1 - \beta f_{max} \exp(-\alpha t - \beta f)} \right] S(f) \quad (5.3)$$

En la ecuación (5.3)  $f$  es la concentración de fibrina,  $f_{max}$  es el valor máximo de la concentración de fibrina [115],  $\alpha$  es la tasa de activación de fibrina relacionada con la tasa de polimerización de las fibras de fibrina [71] y  $\beta$  es el factor de calidad de sangre que relaciona la conversión de fibrinógeno en fibrina con el número de plaquetas [141]. La función  $S(F)$  se encarga de transmitir el patrón de conversión iniciado en (5.2) y corresponde a una función de activación escalón dada por la expresión:

$$S(f) = \frac{w^p}{f^p + w^p} \quad (5.4)$$

donde  $w$  es el valor umbral de polimerización y  $p$  es una constante que ajusta la pendiente de la activación.

A partir de un análisis numérico dimensional, del análisis de la literatura disponible y utilizando los resultados reportados para el modelo de glucólisis que genera patrones espaciotemporales similares a los buscados [125], se obtienen los valores de los parámetros del modelo descrito por las ecuaciones (5.2) y (5.3). La tabla 5.1 resume estos valores. Una revisión detallada de su origen puede encontrarse en el Apéndice B.

| Parámetro | Valor                   | Unidades                          |
|-----------|-------------------------|-----------------------------------|
| $D_T$     | $5,0417 \times 10^{-4}$ | $\text{mm}^2/\text{s}$ [142]      |
| $D_F$     | $5,647 \times 10^{-5}$  | $\text{mm}^2/\text{s}$ [143, 144] |
| $k_1$     | $2,0 \times 10^{-3}$    | $\text{s}^{-1}$                   |
| $k_2$     | $102 \times 10^{-6}$    | $\text{s}^{-1}$                   |
| $k_3$     | $1,7 \times 10^{-3}$    | $\text{s}^{-1}$                   |
| $k_4$     | $50 \times 10^{-6}$     | $\text{s}^{-1}$                   |
| $k_5$     | $102 \times 10^{-6}$    | $\text{s}^{-1}$                   |
| $k_6$     | $1,7 \times 10^{-3}$    | $\text{s}^{-1}$                   |
| $f_{max}$ | 2,5                     | $\text{mg}/\text{ml}$ [115]       |
| $\alpha$  | 0,5                     | $\text{s}^{-1}$ [71, 145]         |
| $\beta$   | 0,4                     | $\text{ml}/\text{mg}$             |
| $w$       | 1,0                     | $\text{mg}/\text{ml}$             |
| $p$       | 10                      | adimensional                      |

Tabla 5.1: Valores de los parámetros del modelo dimensional.

## 5.3. Simulación Numérica

### 5.3.1. Descripción de la Simulación

El modelo es discretizado utilizando el método de los elementos finitos para la discretización espacial y un esquema de diferencias finitas implícito del tipo *Backward Euler* para la discretización temporal. El sistema no lineal resultante se resuelve utilizando el *método de Newton-Raphson*. Una explicación detallada de estos métodos se encuentra en el Apéndice A. La solución se obtuvo usando como dominio una malla bidimensional de elementos lineales que reproduce una sección de la interfase entre el borde del hueso y el perfil de rosca de un implante dental (figura 5.3). La geometría y dimensiones del perfil del implante se obtuvieron a partir de información proporcionada por el fabricante de implantes dentales MIS Technologies Ltd. (Shlomi, Israel). El ancho de la interfase corresponde a observaciones experimentales del espesor de la capa de proteínas que se adhiere a la superficie del implante y del volumen



de tejido necrótico causado por el procedimiento de inserción [26, 146].

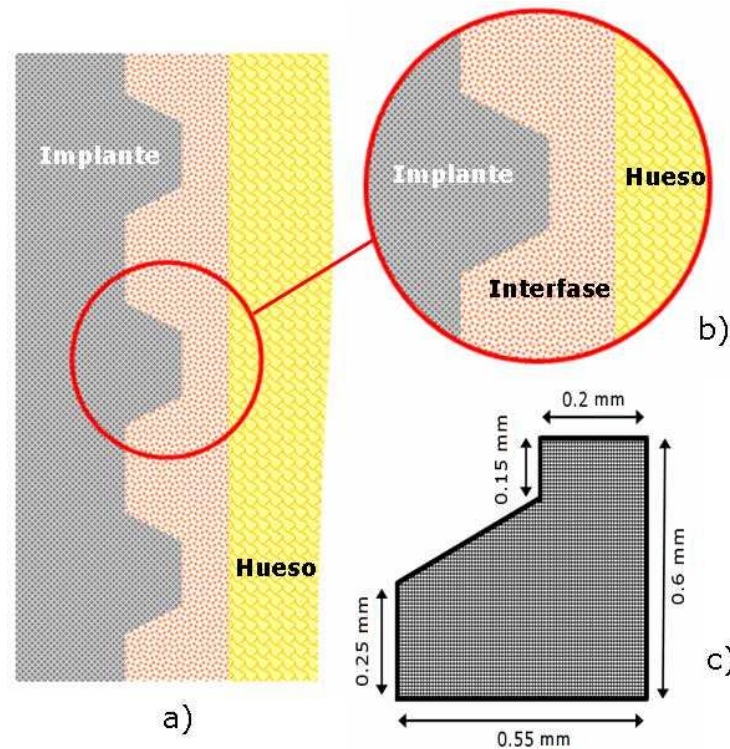


Figura 5.3: a) Esquema del sitio de inserción de un implante dental. b) Geometría de la interfase formada entre el hueso y el implante. c) Diagrama y dimensiones de la sección de interfase usada como dominio bidimensional.

La malla finalmente utilizada consta de 18.728 elementos cuadriláteros bilineales de cuatro nodos para un total de 18.417 nodos. Las condiciones iniciales para las ecuaciones de trombina y fibrinógeno corresponden a pequeñas perturbaciones del estado estable obtenido mediante el análisis matemático de las ecuaciones de reacción-difusión y el denominado espacio de Turing [121]. Como la fibrina es un producto de la reacción cinética entre la trombina y el fibrinógeno, la condición inicial para la ecuación (5.3) se supone igual a cero. En todos los casos se asumen condiciones de flujo en el contorno iguales a cero, lo que supone la formación de un tapón inicial de plaquetas que detiene el flujo de sangre en la zona de la lesión. El tiempo de simulación corresponde al tiempo necesario para la formación de la fibrina y del coágulo final y se asume igual a diez minutos [147]. La solución computacional se obtuvo usando un computador portátil con procesador AMD Turion 64X2 1.6GHz, 2GB RAM en un tiempo total de cuatro y media horas.

### 5.3.2. Casos Analizados

Como se describió en la introducción, las plaquetas hacen parte del proceso de formación del coágulo final. En condiciones normales, una persona tiene entre  $150 \times 10^9$  y  $400 \times 10^9$  plaquetas por litro de sangre [148]. Sin embargo, desordenes del mecanismo de producción de las plaquetas alteran el nivel normal de concentración de estas células y causan anomalías en el proceso de coagulación [140]. El aumento en el nivel de plaquetas ( $600 \times 10^9$  -  $700 \times 10^9$  células por litro) causa *trombocitosis*, un desorden de la sangre que usualmente es asintomático pero que aumenta el riesgo de formación de trombos, infartos cardíacos e isquemia localizada [149]. En casos de trombocitosis extrema el número de plaquetas puede ser incluso mayor a  $1.000 \times 10^9$  células por litro [150]. Por el contrario, la disminución en el nivel de plaquetas (menos de  $150 \times 10^9$  células por litro) o *trombocitopenia* es un desorden caracterizado por la inadecuada formación del coágulo y el aumento en el riesgo de sangrado [149], que puede ser espontáneo si el número de plaquetas es menor a  $20 \times 10^9$  células por litro [140, 151].

Para la evaluación del modelo matemático propuesto se toma como ejemplo una condición clínica en la que el conteo de plaquetas es normal y se simula la formación de la red de fibrina. Adicionalmente se toman por separado una condición de trombocitosis y una de trombocitopenia. En los dos casos se simuló la formación de la red de fibrina. En todos los casos se mantuvieron las condiciones iniciales y de contorno ya mencionadas. Los cambios en los parámetros para las simulaciones de trombocitosis y trombocitopenia se explican en detalle en los Apéndices C y D respectivamente

### 5.3.3. Resultados

El modelo que aquí se presenta simula la formación del coágulo de sangre en la interfase hueso-implante dental a partir de la reacción cinética entre la trombina y el fibrinógeno. Esta reacción está caracterizada por la formación de patrones espacio-temporales que suponen la formación de la red de fibrina que compone el coágulo final (figura 5.4). A partir del estado inicial en el que no existe fibrina (figura 5.4a), el modelo predice la aparición del patrón espacio-temporal en 2 minutos (figura 5.4b), 5 minutos (figura 5.4c) y 10 minutos (figura 5.4d). Como el tiempo necesario para la formación del coágulo de fibrina es de 10

minutos [15,147], se supone este tiempo como el tiempo en el que el patrón alcanza su estado estable. En ningún caso el patrón espacio-temporal toma valores de concentración superiores a 2.5 mg/ml, que corresponde al valor máximo dado por la concentración típica de fibrina que se reporta en [115].

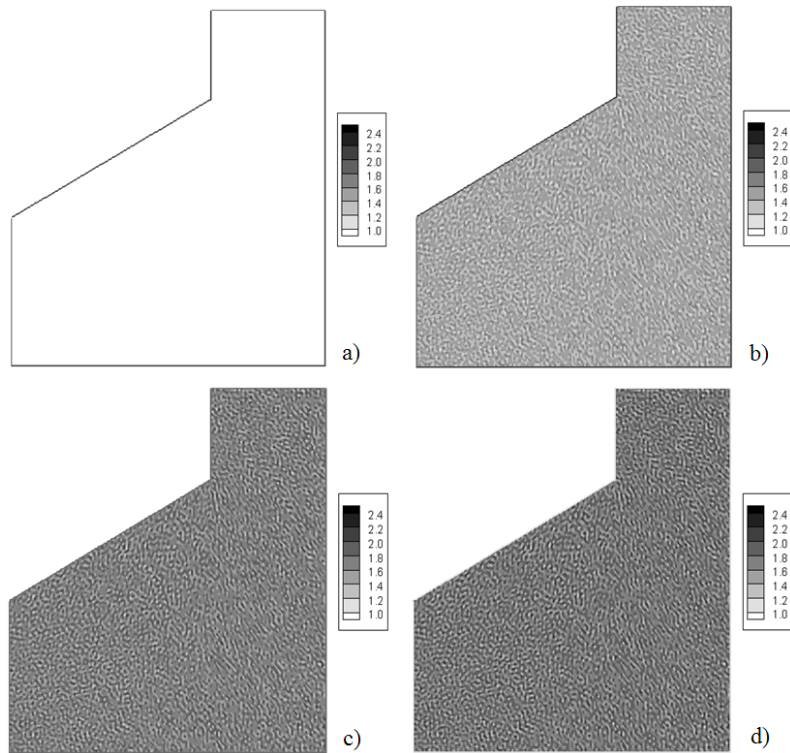


Figura 5.4: Evolución temporal de la formación de fibrina en el dominio bidimensional (en mg/ml) a) Condición inicial, b) 2 minutos, c) 5 minutos, d) 10 minutos.

Para observar la evolución temporal de la formación fibrilar, se seleccionó un punto cerca del centro del dominio y se extrajeron los valores de trombina, fibrinógeno y fibrina. Las figuras 5.5 - 5.7 resumen los valores obtenidos, de las cuales puede verse que mientras la concentración de trombina disminuye en el tiempo, la concentración de fibrinógeno aumenta hacia su estado estable. Este hecho pone en evidencia la reacción cinética de activación existente entre las dos sustancias, es decir, la concentración de trombina disminuye por el consumo que se requiere para la transformación del fibrinógeno en fibrina mientras la activación de plaquetas por la presencia de trombina aumenta la concentración de fibrinógeno [141]. Luego el fibrinógeno comienza su transformación en fibrina con lo cual la concentración de esta última aumenta hasta alcanzar el valor de estado estable [71].

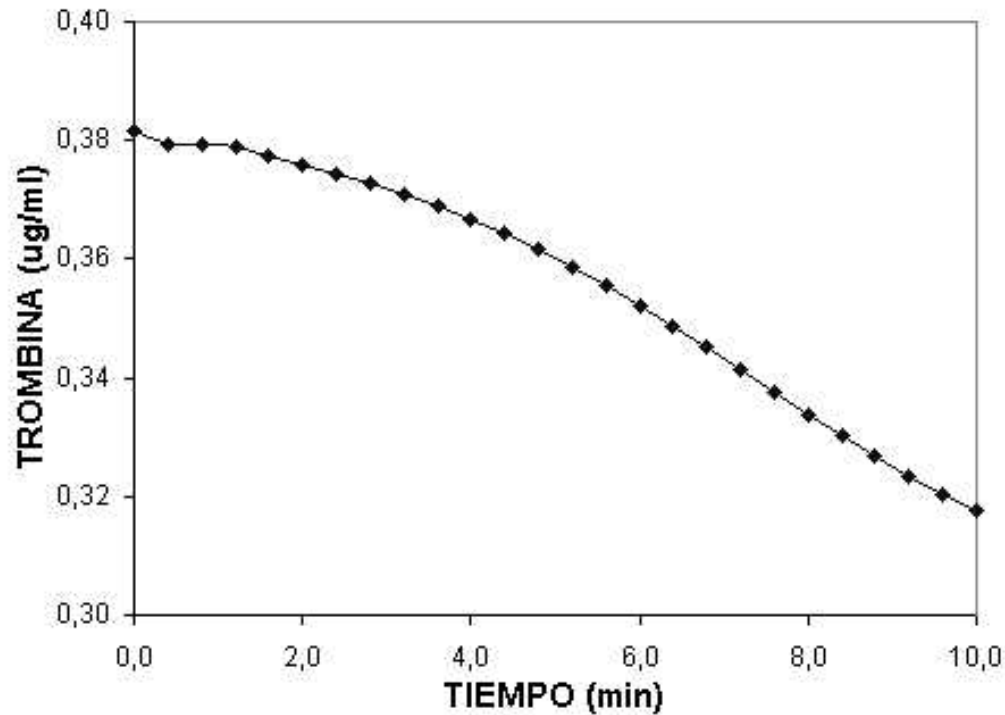


Figura 5.5: Evolución temporal de la concentración de trombina para un punto cercano al centro del dominio bidimensional.

La característica espacial propia de esta reacción conduce a la formación de un patrón de fibras de fibrina. Haciendo un acercamiento mediante la reducción del dominio a un cuadrado de  $1 \mu\text{m}$  de lado y el escalamiento espacial del modelo, es posible apreciar en detalle la distribución fibrilar de la fibrina en estado estable (figura 5.8). Esta distribución está caracterizada por el agrupamiento de zonas de igual concentración de fibrina en arreglos similares a fibras entrelazadas que en ningún caso sobrepasan el valor de concentración máximo de fibrina, es decir,  $2,5 \text{ mg/ml}$  [115].

Ya que la formación del patrón espacio-temporal está relacionada con la activación de plaquetas, la variación en la concentración de estas células conduce a variaciones en los niveles de fibrinógeno y éstas a su vez a variaciones en los niveles de fibrina. Debido a esto, el modelo puede extenderse al análisis de los dos desórdenes plaquetarios antes mencionados: trombocitosis y trombocitopenia. En la figura 5.9a se muestra el estado estable alcanzado por la fibrina cuando la concentración de plaquetas es  $1.000 \times 10^9$  células por litro. Bajo estas condiciones, aunque la concentración de fibrina se mantiene dentro de su valor máximo, se

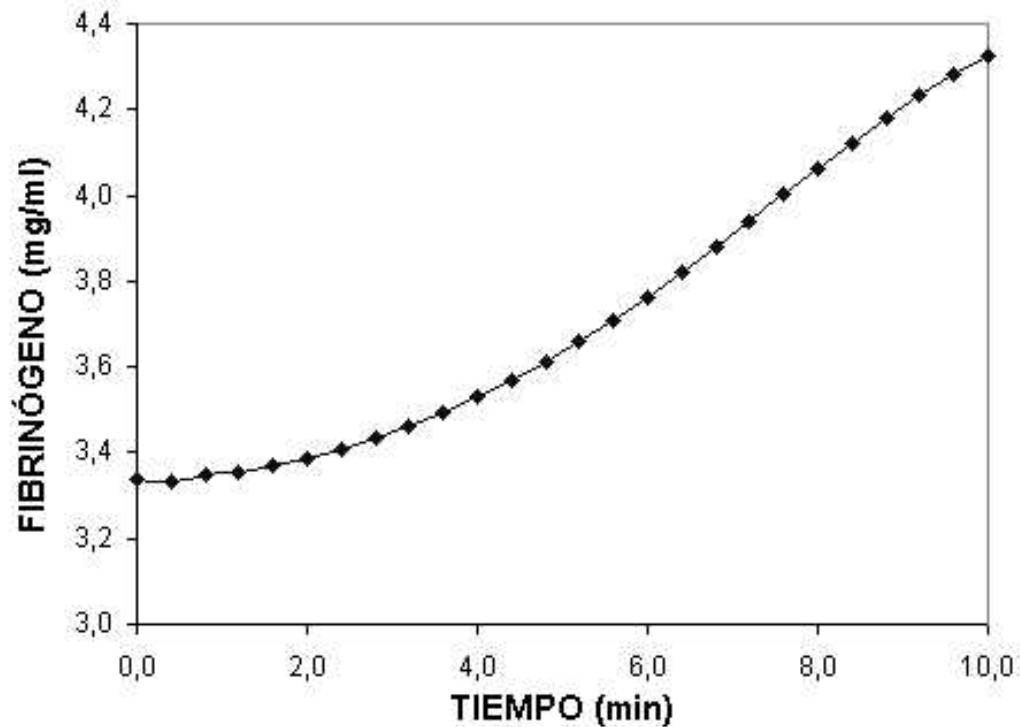


Figura 5.6: Evolución temporal de la concentración de fibrinógeno para un punto cercano al centro del dominio bidimensional.

observa que la densidad de la formación del patrón es mayor respecto al resultado de la figura 5.4d, donde la concentración de plaquetas usada es  $300 \times 10^9$  células por litro. En contraste, cuando la concentración de plaquetas disminuye a  $20 \times 10^9$  células por litro, nivel característico de la trombocitopenia, se obtiene un patrón de fibrina cuyo estado estable tiene una densidad menor respecto de la figura 5.4d. Este resultado se muestra en la figura 5.9b.

Aunque cualitativamente se puede observar que en las figuras 5.4, 5.9a y 5.9b existen diferencias en la densidad del patrón espacio-temporal, una prueba sencilla permite cuantificar esta diferencia. Tomando los estados estables de fibrina en cada uno de los tres casos, es decir, nivel normal de plaquetas, trombocitosis y trombocitopenia, se realizó una ponderación en el dominio obteniendo el valor medio de la concentración de fibrina. En el caso del valor normal de plaquetas se obtuvo como valor medio una concentración de 1.7552 mg/ml. Por su parte, en trombocitosis se obtuvo una concentración de 1.9961 mg/ml, mientras que en trombocitopenia se obtuvo un valor de 1.2206 mg/ml. Comparando los resultado se observa cuantitativamente que el número de plaquetas modifica la concentración media de fibrina

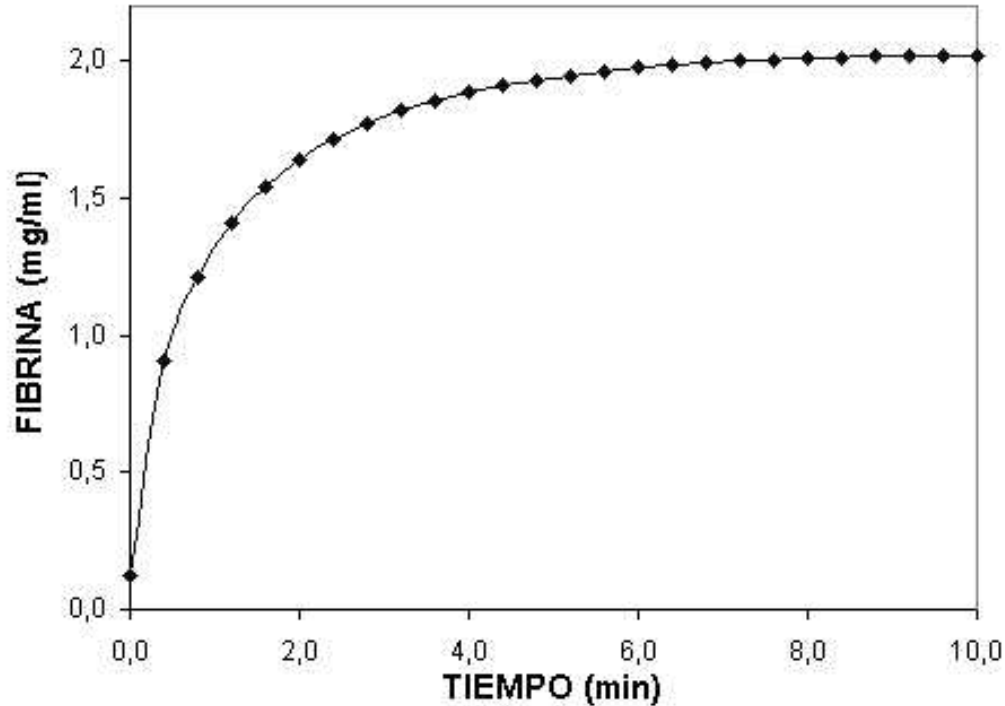


Figura 5.7: Evolución temporal de la concentración de fibrina para un punto cercano al centro del dominio bidimensional.

formada y en consecuencia, la calidad del coágulo final. Es decir, en el caso de trombocitosis la mayor densidad en el coágulo indica una mayor probabilidad de formación de fragmentos o trombos, mientras que en el caso de trombocitopenia una menor densidad del coágulo indica la mayor probabilidad de hemorragias y sangrado espontáneo, lo cual concuerda con lo que se reporta en la literatura medica [140, 150].

Para la predicción de la formación de la red fibrilar, las suposiciones hechas a la cadena de la coagulación permiten obtener resultados que concuerdan con el caso experimental. Prueba de ello es la asimetría del patrón espacio-temporal obtenido y las dimensiones de las fibras de fibrina. Microfotografías tomadas a coágulos de sangre formados un día después de la fractura del fémur de una rata muestran la disposición que a manera de puntos alargados adquiere la red de fibrina [152] de manera semejante al patrón mostrado en la figura 5.4. Adicionalmente, pruebas experimentales han establecido que las fibras de fibrina pueden tener entre 100 y 500 nm de ancho [71, 115, 153]. En la figura 5.8 se observa que el ancho de las fibras (gris

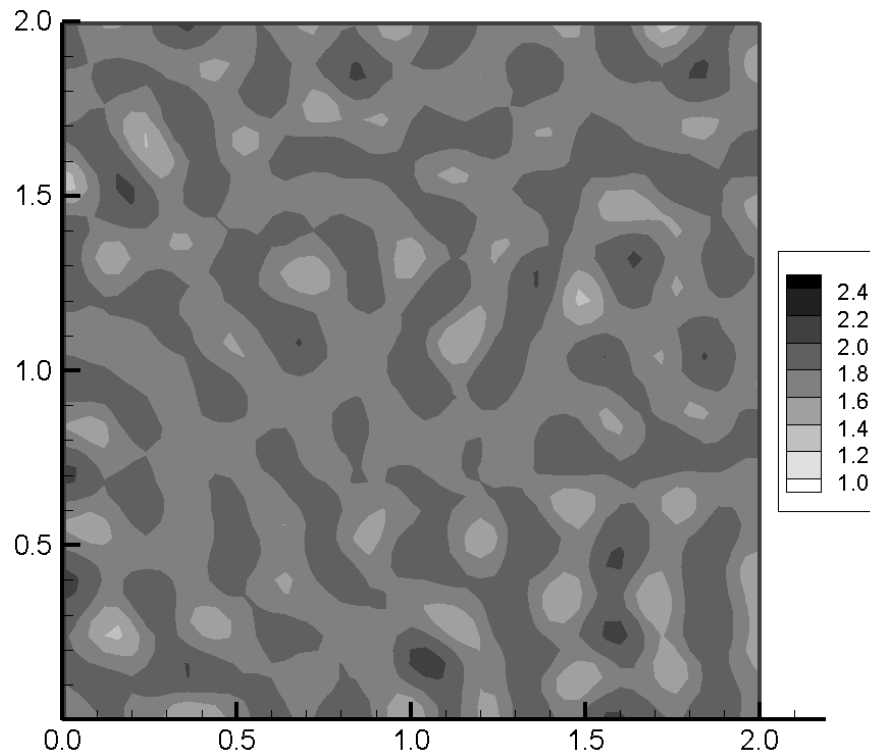


Figura 5.8: Detalle del estado estable de la formación de fibrina (en mg/ml).

oscuro) obtenido mediante la simulación es de aproximadamente 250 nm, valor que se ajusta al intervalo experimental mencionado.

## 5.4. Discusión

El objetivo de este trabajo es presentar un modelo matemático de la coagulación en la interfase hueso-implante dental. El modelo está basado en dos suposiciones. En primer lugar se adopta un enfoque reducido del fenómeno de la coagulación en el cual la formación del coágulo de fibrina depende de la reacción cinética entre la trombina y el fibrinógeno. Este hecho permite simplificar el fenómeno de la coagulación al iniciarlo luego que los factores de coagulación activan la vía común y comienza la formación de la red de fibras de fibrina [68,70,134]. En la segunda suposición se han considerado el tiempo de coagulación y el número de plaquetas como indicadores del tipo de coágulo formado. Esta segunda hipótesis garantiza que el modelo no sólo tenga en cuenta la interacción bioquímica de las dos sustancias de interés sino también el tiempo de coagulación y la concentración de células sanguíneas, en este caso,

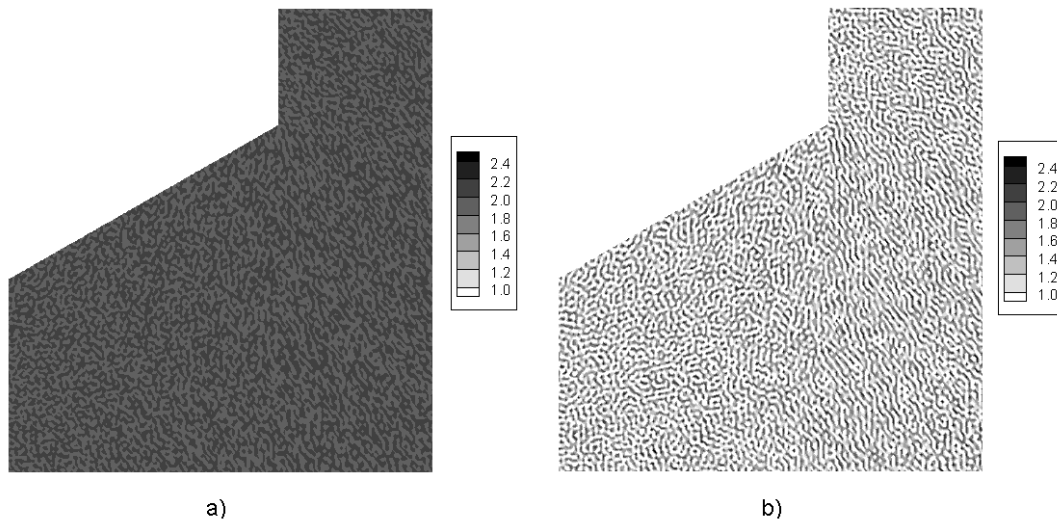


Figura 5.9: a) Estado estable de la fibrina cuando la concentración de plaquetas corresponde a trombocitosis (en mg/ml). b) Estado estable de la fibrina cuando la concentración de plaquetas corresponde a trombocitopenia (en mg/ml).

las plaquetas [110,137,138]. Bajo estas suposiciones el modelo es capaz de predecir la formación de la red de fibras de fibrina en una sección de la interfase hueso-implante dental a partir de la aparición de patrones espacio-temporales distribuidos en el dominio analizado aplicando una restricción para la estabilidad en el tiempo [147] y una característica de formación dada por la concentración de plaquetas [24,151].

Se debe admitir que el modelo es sólo una aproximación a la realidad del fenómeno biológico de la coagulación, y por lo tanto, existen una serie de limitaciones asociadas al enfoque utilizado. La primera limitación consiste en la simplificación hecha a la cadena de eventos moleculares que rodean la coagulación. Como se describe en la figura 5.2, la formación de la red de fibrina es una consecuencia de la activación de la vía intrínseca y extrínseca que confluyen en la denominada vía común. En el modelo presentado, la vía común se supone iniciada mientras que la formación del coágulo comienza a partir de la conversión de fibrinógeno en fibrina. No obstante, la activación de las vías intrínseca y extrínseca es un aspecto de interés al interior de la realidad biológica del proceso de coagulación porque supone la activación de una amplia cadena de moléculas que han sido estudiadas por múltiples trabajos experimentales y que en algunos casos siguen siendo motivo de investigación [111].



La segunda limitación está relacionada con la activación celular y molecular causada por la superficie del implante dental. Está ampliamente reportado que la superficie del implante dental estimula la activación de las plaquetas y el anclaje de las redes de fibrina que posteriormente proporcionan el soporte para la migración y diferenciación de las células osteoprogenitoras encargadas de la recuperación del hueso lesionado [15, 24]. Aunque en el modelo propuesto no se tiene en cuenta este aspecto, se reconoce que la superficie del implante influye no sólo en la formación del coágulo de fibrina sino en la adecuada oseointegración del implante, razón por la cual, la extensión del modelo al caso general de recuperación ósea debe considerar la superficie bioactiva del implante.

La tercera limitación está relacionada con las condiciones iniciales y de contorno. Si bien las condiciones iniciales fueron obtenidas de las concentraciones promedio reportadas en la literatura, de la cadena de activación de los factores de coagulación durante las vías intrínsecas y extrínsecas dependen las concentraciones que finalmente se encuentran en la etapa de conversión de fibrinógeno a fibrina [70, 71, 134]. Estas variaciones afectan la formación de la red fibrilar, y por lo tanto, un análisis completo de la cadena de eventos moleculares previos a la conversión del fibrinógeno en fibrina permite ampliar la aplicación del modelo a desórdenes de la actividad molecular de algunos factores de coagulación, células y tejidos que alteran las concentraciones iniciales de trombina, fibrinógeno y fibrina [134]. En cuanto a las condiciones de contorno, asumir el flujo de sangre igual a cero en el tiempo cero supone la formación de un coágulo inicial que detiene la pérdida de sangre y confina la sangre infiltrada a interfase hueso-implante dental. Este coágulo inicial supone la activación de las plaquetas y la activación del proceso de vasoconstricción de los vasos sanguíneos averiados [68]. Sin embargo, en el acercamiento realizado a través del modelo, la vasoconstricción, y en general, la recuperación de la red vascular no se tiene en cuenta ya que la cantidad de sangre infiltrada en la zona de la lesión no es un parámetro analizado, y además es suficiente con suponer una concentración promedio de plaquetas en sangre para referirse a su activación y agregación. Adicionalmente, la recuperación de la red vascular se considera igual a la formación de la red fibrilar, toda vez que la formación de fibrina se da a lo largo de los vasos sanguíneos recuperados [15].

En cuarto lugar, los parámetros del modelo fueron algunos estimados de la literatura disponible, otros fueron estimados a partir de resultados experimentales y otros fueron tomados directamente de trabajos numéricos previamente reportados. Sin embargo, el valor exacto de

muchos de ellos es una incógnita, siendo necesario ajustarlos de manera que la formación de los patrones espacio-temporales fuera la esperada (Apéndice B). La dificultad para obtener los valores adecuados a partir de pruebas experimentales es una debilidad que comparte el modelo con otros trabajos en el área del modelado computacional de fenómenos biológicos. Sin embargo, se debe destacar que los valores hallados numéricamente se pueden correlacionar con otros encontrados en trabajos experimentales, lo cual hace que el modelo sea viable desde el punto de vista biológico.

A pesar de estas limitaciones, el modelo presentado puede considerarse como un avance en el modelado computacional de la coagulación, en especial por adoptar características de cada uno de los tres tipos de modelos tradicionalmente reportados. En particular, la posibilidad de predecir la formación del coágulo respecto a variaciones de la concentración de plaquetas es una forma sencilla de analizar desórdenes hematológicos, en especial cuando en la práctica médica el diagnóstico de estos desórdenes depende de pruebas de conteo celular [150, 151]. Finalmente, la complejidad del fenómeno biológico obliga a realizar simplificaciones de manera que se pueda obtener un modelo viable para su solución computacional. No obstante las limitaciones, los resultados obtenidos muestran la capacidad del modelo presentado de reproducir características importantes del proceso biológico de la coagulación en implantes dentales que concuerdan con resultados experimentales [24, 139, 152].

La ampliación del modelo presentado con las etapas de recuperación tisular posteriores a la coagulación de la interfase hueso-implante dental debe permitir obtener resultados ajustados al proceso de oseointegración, toda vez que la formación de nuevo hueso depende en gran medida de una adecuada formación de la red de fibras de fibrina sobre la cual inicia la migración y diferenciación de células osteoprogenitoras [15, 24]. El modelo presentado, en concordancia con la perspectiva biológica, contiene las bases para el modelado de las siguientes etapas de recuperación ósea y plantea la necesidad de tener en cuenta la superficie bioactiva del implante dental no sólo como agente modificador de la estructura tisular en la interfase hueso implante dental sino como una superficie que modifica las condiciones iniciales y de contorno del modelo.

## CAPÍTULO 6

# MODELO MECANOBIOLOGICO DE LA OSEOINTEGRACIÓN DE UN IMPLANTE DENTAL

### 6.1. Introducción

Desde el punto de vista biológico, la cicatrización de la interfase hueso-implante dental puede resumirse en cuatro etapas [15,23]: 1) coagulación de la sangre, 2) migración de células osteoprogenitoras, 3) formación de tejido granular (matriz de colágeno y nuevos vasos sanguíneos), y 4) formación de nueva matriz ósea. Esta cicatrización está condicionada al entorno mecánico creado por los efectos de adhesión molecular y celular [21], los efectos de contracción debidos a la migración celular [24] y el proceso de mecanotransducción ósea que regula la formación de nuevo hueso por acción de las fuerzas externas [18,25].

Por su parte, la superficie del implante modifica la actividad celular y molecular en la interfase, de manera que las superficies con alta rugosidad permiten mayor adhesión de células y moléculas [26,27]. Esto causa mayor adhesión y formación de tejidos alrededor del implante, y por lo tanto una adecuada oseointegración [4,19]. Por el contrario, las superficies con baja rugosidad no ofrecen suficiente adhesión a células y moléculas de manera que las fuerzas de contracción producidas por la migración celular pueden separar los tejidos en formación de la superficie del implante [19]. Esto crea una brecha entre el implante y el frente de recuperación tisular que disminuye el grado de oseointegración y puede causar la pérdida del implante [4,24,

28]. Por su parte, La presencia continua de los estímulos mecánicos permite la consolidación del nuevo tejido óseo y la correcta cicatrización de la interfase hueso-implante dental [25,104]. Este balance entre estímulo mecánico y proceso biológico es la realidad anatómica y funcional de la mecanobiología como área de la ciencia que estudia la acción biológica del estímulo mecánico y la acción de éste en la arquitectura de los tejidos [29].

Aunque gran parte del conocimiento que se tiene sobre la cicatrización de la interfase proviene de trabajos experimentales, en los últimos años se han obtenido resultados cuantitativos a partir del desarrollo de modelos matemáticos computacionales que analizan numéricamente los procesos biológicos y los fenómenos mecánicos. Por lo tanto, un adecuado balance entre la mecanobiología experimental y la computacional permite una mejor interpretación de los resultados experimentales y una mejor provisión de datos para los modelos matemáticos [29].

Desde la perspectiva biológica se han formulado modelos matemáticos de la recuperación tisular en la interfase hueso-implante dental basados en los procesos de diferenciación, proliferación y migración celular, y el comportamiento transitorio de la matriz extracelular [32, 33, 154]. Aunque los resultados numéricos obtenidos se correlacionan con resultados experimentales, en ninguna de las formulaciones se tiene en cuenta que la interfase hueso-implante dental es una entidad viva cuyas propiedades están continuamente cambiando debido a factores mecánicos [18,25]. Otros autores han realizado simulaciones del comportamiento de la interfase hueso-implante dental desde un enfoque mecánico que utiliza como parámetros la geometría y material del implante, las propiedades del hueso y los niveles carga aplicados [30, 31, 47]. En estos casos, aunque las descripciones hechas a la interfase no incluyen variables biológicas ni se ajustan a ningún patrón de comportamiento bioquímico, la relación entre los estímulos mecánicos y la diferenciación tisular permite obtener resultados ajustados a observaciones experimentales.

Aunque el interés de estos modelos es incuestionable, se ha establecido que una descripción de la interfase hueso-implante dental que combine los aspectos biológicos de la recuperación tisular con los factores mecánicos asociados permite obtener un modelo matemático de la oseointegración más ajustado a la realidad fisiológica del problema [33, 154]. En este capítulo se presenta un nuevo modelo matemático de la oseointegración de un implante dental basado

en la descripción de la cicatrización en la interfase hueso-implante dental. A diferencia de otros modelos, el enfoque que se presenta considera la cicatrización como un proceso biológico secuencial mediado por los factores mecánicos y la superficie del implante. Este enfoque complementa modelos anteriores permitiendo combinar el entorno biológico, entorno mecánico y la influencia de la superficie del implante en la consolidación de una adecuada oseointegración. Por lo tanto, con la solución del modelo se busca establecer una relación entre el tipo de superficie usada en el implante dental y el nuevo hueso formado en la interfase. Para validar el modelo se realizaron simulaciones computacionales utilizando el método de los elementos finitos en las que se consideran tres tipos de superficie de implante dental: superficie rugosa, superficie mediamente rugosa y superficie lisa. Los resultados obtenidos concuerdan cualitativamente con resultados experimentales a nivel tanto espacial como temporal. Se concluye que el modelo puede ser utilizado como base metodológica para la creación de una herramienta de uso odontológico que permita predecir el grado de oseointegración de un implante dental en función de características anatómicas y fisiológicas del hueso receptor, el diseño del implante y la distribución de cargas entre el hueso y el implante [5,6]. En la siguiente sección se describe el modelo matemático propuesto. Luego se realiza la descripción de la simulación, los casos analizados y los resultados obtenidos. Finalmente se presenta la discusión de las limitaciones del modelo y las aplicaciones futuras.

## 6.2. Materiales y Métodos

### 6.2.1. Mecanobiología de la interfase hueso-implante dental

La cicatrización de la interfase hueso-implante dental es un proceso complejo que involucra un amplio número de células, moléculas y fenómenos mecánicos. Sin embargo, para la formulación de nuestro modelo matemático se ha recurrido a una descripción simplificada, y por lo tanto incompleta, de la realidad mecanobiológica de la interfase. Una revisión más detallada se presentó en el capítulo 3 [15–18, 23, 152].

En términos generales, el proceso biológico de cicatrización de la interfase hueso-implante se compone de cuatro etapas, cada una asociada a un evento biológico característico [15, 23] (figura 3.1): 1) formación del hematoma (sangrado y coagulación), 2) degradación del coagulo y

limpieza de la herida (fibrinólisis), 3) formación de tejido granular (fibroplasia y angiogénesis), y 4) formación de nuevo osteoide (modelado óseo).

Con el sangrado provocado durante el procedimiento quirúrgico de inserción de un implante dental [55,56] se activan los eventos biológicos que culminan con la cicatrización de la interfase hueso-implante dental. Inicialmente los vasos sanguíneos averiados se contraen y las plaquetas provenientes del torrente sanguíneo se activan formando un tapón que detiene temporalmente el flujo de sangre [70,73]. Este tapón temporal es luego reemplazado por un tapón hemostático formado por la reacción cinética entre la trombina y el fibrinógeno, dos proteínas presentes en la sangre [46,73,74]. La trombina convierte el fibrinógeno en fibras de *fibrina* [70,71]. Estas fibras se acumulan formando el *coágulo de fibrina* que detiene completamente el flujo de sangre y además protege los tejidos dejados al descubierto tras la inserción del implante [15]. Luego de la coagulación, algunas de las fibras de fibrina son degradadas para permitir el avance de las células madre encargadas de restaurar los tejidos [68,76]. Esta degradación es realizada por la *plasmina*, una proteína presente en el plasma sanguíneo en su forma inactiva plasminógeno [15,76,78], y acompañada por la actividad de limpieza de macrófagos y neutrófilos [23,24].

Alrededor del cuarto día de cicatrización, un proceso conocido como *fibroplasia* inicia el reemplazo del coágulo de fibrina por una nueva matriz extracelular conocida como *tejido granular* compuesta en gran medida colágeno y los nuevos capilares formados durante la angiogénesis [15]. Esta nueva matriz facilita la migración de las *células osteogénicas* [23], estimuladas por el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor TGF- $\beta$  [24] y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) [75]. Entre el 7-10 día de cicatrización, algunos de los fibroblastos en la herida se transforman en *mioblastos* [16] caracterizados por tener microfilamentos citoplasmáticos de  *$\alpha$ -actina de músculo liso* que les permite generar fuerzas contráctiles responsables de la contracción de la herida [15,16,24].

Cerca del día 14 después de la lesión [23,75] se inicia la *osteogénesis* o formación de nuevo hueso a lo largo de las estructuras vasculares [23,62]. Durante la osteogénesis, el tejido granular es reemplazado por fibras de colágeno que poco a poco son mineralizadas para crear la nueva matriz ósea [25,62]. En el caso de los implantes dentales, la osteogénesis puede ser directa y de contacto [24]. En la *osteogénesis directa* el nuevo óseo se forma desde el borde del hueso receptor. En la *osteogénesis de contacto*, el nuevo hueso se forma desde la superficie del

implante. Este tipo de osteogénesis depende de dos fenómenos asociados al implante dental: *osteoinducción* y *osteoconducción* [24, 34]. La osteoinducción es el reclutamiento de células madre que de alguna manera son estimuladas a proliferar como células formadoras de matriz ósea. Si estas células logran colonizar la superficie del implante dental entonces se dice que esta superficie es osteoinductiva [34]. Por su parte, la osteoconducción se define como la formación de hueso sobre la superficie del implante [24, 34]. Este fenómeno depende esencialmente de la *biocompatibilidad* del material del implante y las características de su superficie [27, 44].

Con el modelado termina el proceso biológico de cicatrización de la interfase hueso-implante dental. Sin embargo, factores como 1) la adhesión celular, 2) la migración y proliferación de las células sobre los tejidos circundantes, y 3) la acción de las cargas internas y externas se encuentran relacionados con la respuesta mecánica de dicha interfase (figura 3.3). Los fenómenos de *adhesión* son aquellos producidos por la fijación de las células a un sustrato [91] y se caracterizan por la presencia de tensiones entre el citoplasma de las células y el sustrato al cual se adhieren [97]. Por su parte, la *contracción* es un fenómeno mecánico producido por las células al desplazarse sobre un sustrato [16]. En la fibroplasia y modelado, los fibroblastos y células osteogénicas se adhieren a la red de fibrina y comienzan a desplazarse a través de ella en un intento por colonizar la superficie del implante lo que crea tensiones que contraen la red y pueden separarla del implante [19, 24]. Finalmente, los fenómenos mecánicos de *activación* son aquellos que en presencia de una carga externa inducen la actividad metabólica necesaria para producir cambios estructurales en la matriz extracelular. En general, estos fenómenos se presentan en la etapa final de la cicatrización de la interfase hueso-implante como parte de la serie de señales biológicas que estimulan la producción o degradación de la nueva matriz ósea en respuesta a los estímulos de carga externa aplicados al implante [6, 25].

### 6.2.2. Modelo Matemático

El enfoque matemático utilizado está basado en el uso de ecuaciones de reacción-difusión que describen la variación en el tiempo  $t$  y en la posición  $\mathbf{x}$  de una sustancia  $u = u(\mathbf{x}, t)$  en un dominio  $\Omega$  (ver ecuación 4.4, rescrita a continuación).

$$\underbrace{\frac{\partial u(t, \mathbf{x})}{\partial t}}_{\text{Tasa de Cambio}} = \underbrace{\nabla \cdot (D \nabla u(t, \mathbf{x}))}_{\text{Término Difusivo}} + \underbrace{f(t, \mathbf{x})}_{\text{Término Reactivo}}$$

A partir de la realidad mecanobiológica de la interfase hueso-implante dental se han identificado cinco etapas principales de las cuales se extraen las variables del modelo (figura 3.5). La primera de ellas es la coagulación de la sangre, simplificada como una reacción cinética entre la *trombina* ( $T(\mathbf{x}, t)$ ) y el *fibrinógeno* ( $F(\mathbf{x}, t)$ ) de la cual se obtiene *fibrina* ( $f(\mathbf{x}, t)$ ). La segunda etapa corresponde a la degradación del coágulo y la migración de *células osteogénicas* ( $C_o(\mathbf{x}, t)$ ) debido a la presencia de un gradiente quimiotáctico [125]. Este gradiente es creado por la activación de las plaquetas que liberan el factor PDGF [70] y por la activación de los factores TGF- $\beta$  y FGF [75]. Sin embargo, considerar estos factores por separado supone un inconveniente debido a la falta de información experimental que permite ajustar los parámetros numéricos y por la mayor complejidad que adquiere el modelo. Por esta razón, estos factores se han reunido en una única variable denominada *químico osteogénico* ( $Q_o(\mathbf{x}, t)$ ). La tercera etapa corresponde al recambio del coágulo de fibrina por el *tejido granular* ( $G(\mathbf{x}, t)$ ). Este tejido granular se supone producido por el contingente de células osteogénicas que agrupa los macrófagos, los fibroblastos y los osteoblastos. La cuarta etapa corresponde a los *desplazamientos netos* ( $U(\mathbf{x}, t)$ ) generados por el contingente de células osteogénicas al migrar sobre el coágulo de fibrina. La quinta etapa es la *osteogénesis* ( $O(\mathbf{x}, t)$ ), que de acuerdo al tipo de superficie presente en el implante dental puede ser directa o de contacto [24]. Un factor adicional que aparece en las ecuaciones pero que no es una variable del modelo es la rugosidad de la superficie del implante  $R_S$ , definida como un valor conocido en el intervalo [0-1].

Definidas las etapas del modelo, a continuación se describen las ecuaciones de cada una de las variables:

### 6.2.3. Trombina

$$\frac{\partial T}{\partial t} = \underbrace{D_T \nabla^2 T}_{\text{Difusión}} + \underbrace{k_1 - k_2 T - k_6 T F^2}_{\text{Reacción}} \quad (6.1)$$

En su forma más simple, la formación del coágulo puede entenderse como la conversión de fibrinógeno en fibrina en presencia de la trombina [70]. Una conversión de este tipo puede des-



cribirse matemáticamente como una reacción cinética de transformación entre una sustancia de activación (trombina) y una sustancia de conversión (fibrinógeno) [121, 125].

La trombina se modela como una sustancia con difusión lineal con coeficiente  $D_T$ . La cinética de transformación está controlada por un término de consumo no lineal con coeficiente  $k_6$  dependiente de la concentración de fibrinógeno. Este término representa el gasto de trombina necesario para activar la conversión de fibrinógeno [70, 71]. La ecuación de trombina se complementa con un término independiente de producción con coeficiente  $k_1$  y un término de consumo lineal con coeficiente  $k_2$  [124, 125].

#### 6.2.4. Fibrinógeno

$$\frac{\partial F}{\partial t} = \underbrace{D_F \nabla^2 F}_{\text{Difusión}} + \underbrace{k_3 - k_4 F + k_5 T + k_6 T F^2}_{\text{Reacción}} \quad (6.2)$$

Al igual que la trombina, el fibrinógeno se modela como una sustancia con difusión lineal con coeficiente  $D_F$ . La reacción cinética de transformación iniciada con la trombina es finaliza con la conversión de fibrinógeno mediante el acople de un término de producción no lineal con coeficiente proporcional a la cantidad de trombina consumida. La ecuación de fibrina se complementa con un término independiente de producción con coeficiente  $k_3$  y un término de consumo lineal con coeficiente  $k_4$  [124, 125].

#### 6.2.5. Fibrina

$$\frac{\partial f}{\partial t} = \underbrace{\left[ \frac{\alpha f_{max}(1 - \exp(-\alpha t - \beta f))}{1 - \beta f_{max} \exp(-\alpha t - \beta f)} \right]}_{\text{Conversión}} \underbrace{\left[ \frac{F^n}{F^n + W_F^n} \right]}_{\text{Activación}} - P_{max} \underbrace{\left[ \frac{W_P^n}{f^n + W_P^n} \right]}_{\text{Degradación}} \quad (6.3)$$

El resultado de la reacción cinética entre la trombina y el fibrinógeno es una proteína conocida como *fibrina* [70, 71]. La producción de fibrina es modelada mediante un término

de conversión exponencial que describe la formación de fibrina desde una concentración inicial igual a cero hasta un nivel de concentración máximo promedio dado por el parámetro  $f_{max}$  [115]. Este mecanismo de conversión exponencial está controlado por un coeficiente  $\alpha$  denominado *tasa de activación de fibrina* que está relacionado con la tasa de polimerización de las fibras de fibrina in-vitro [71].

Durante la coagulación, las plaquetas se encargan de detener el flujo de sangre al liberar una serie de gránulos [68]. Estos gránulos contienen varias moléculas que gobiernan la actividad inicial en la zona de la lesión entre las que se destaca el fibrinógeno [70, 71]. Como la fibrina proviene de la transformación del fibrinógeno, el mecanismo de conversión de fibrina es ajustado por un coeficiente  $\beta$  denominado *factor de calidad de sangre* que relaciona el número de plaquetas activadas y la concentración de fibrinógeno liberada por ellas con la concentración final de fibrina [141]. La ecuación de fibrina se complementa con un término de activación encargado de transmitir el patrón de conversión del fibrinógeno. Este término es controlado por un valor mínimo en la concentración de fibrinógeno  $W_F$  necesario para obtener el patrón fibrilar característico del coágulo de fibrina [115]. Finalmente, el proceso de degradación del coágulo previo a la migración celular es modelado a partir de un término de degradación con coeficiente  $P_{max}$  que representa la degradación de la fibrina por acción de la plasmina [76] en función de un valor mínimo de concentración de fibrina  $W_P$ .

### 6.2.6. Células Osteogénicas

$$\frac{\partial C_o}{\partial t} = \underbrace{\nabla \cdot \left[ D_{C_o} \nabla C_o - \underbrace{H_{C_o} C_o \nabla Q_o}_{\text{Quimiotaxis}} \right]}_{\text{Difusión}} + \underbrace{r_{C_o} C_o \left[ 1 - \frac{C_o}{C_i} \right] \left[ \frac{Q_o^n}{Q_o^n + W_{Q_o}^n} \right]}_{\text{Proliferación}} - \underbrace{\delta_{C_o} C_o}_{\text{Muerte}} \quad (6.4)$$

El flujo de células osteogénicas está descrito como un dispersión aleatoria controlado por la presencia de un químico osteogénico [121, 125]. Esto se expresa matemáticamente como una difusión lineal con coeficiente  $D_{C_o}$  acompañada de quimiotaxis lineal con coeficiente de sensibilidad  $H_{C_o}$  en la dirección del gradiente de químico osteogénico. La proliferación

celular es modelada con un término logístico lineal [125] con coeficiente  $r_{C_o}$  y saturación en  $C_i$  controlado por una función de activación cuyo valor umbral  $W_{Q_o}$  corresponde a la concentración mínima de químico osteogénico necesaria para iniciar la migración celular [121, 125]. La ecuación se complementa con un término de muerte celular con coeficiente  $\delta_{C_o}$ .

### 6.2.7. Químico Osteogénico

$$\frac{\partial Q_o}{\partial t} = \underbrace{D_{Q_o} \nabla^2 Q_o}_{\text{Difusión}} + \underbrace{r_{Q_o} C_o + r_{QD} \left[ \frac{f^n}{f^n + W_f^n} \right]}_{\text{Producción}} - \underbrace{\delta_{Q_o} Q_o - \delta_{QC} C_o Q_o}_{\text{Consumo}} \quad (6.5)$$

La dispersión aleatoria del químico osteogénico es representada como un término de difusión lineal con coeficiente  $D_{Q_o}$ . El químico osteogénico es liberado por las plaquetas activadas y la actividad proliferativa de las células osteogénicas en migración [68, 70]. Por lo tanto, su producción es modelada por un término lineal con coeficiente  $r_{Q_o}$  dado en función de la concentración de células osteogénicas y un término independiente con coeficiente  $r_{QD}$  asociado a una función de activación controlada por la concentración de fibrinógeno  $W_f$  presente en los sitios de agregación y activación plaquetaria [70, 75]. Por su parte, el consumo de químico está representado por un término lineal de decaimiento con coeficiente  $\delta_{Q_o}$  y un término no lineal con coeficiente  $\delta_{QC}$  que representa el consumo por parte de la concentración de células osteogénicas.

### 6.2.8. Tejido Granular

$$\frac{\partial G}{\partial t} = \underbrace{[r_G F - \delta_G G]}_{\text{Reacción}} \underbrace{\left[ \frac{C_o^n}{C_o^n + W_{C_o}^n} \right]}_{\text{Activación}} \quad (6.6)$$

El cambio del coágulo de fibrina por la matriz de tejido granular es modelado como una ecuación de reacción lineal controlado por un término de activación. El término reactivo

está dado en función de un término de producción con constante  $r_G$  y un término de degradación con constante  $\delta_G$ . El término de activación transmite el patrón de dispersión de las células osteogénicas en función de un valor umbral  $W_{C_o}$ , relacionado con la densidad mínima de células osteogénicas necesaria para iniciar el recambio. En cuanto al término de activación, se ha establecido que el tejido granular se forma a lo largo de la red de fibras que compone el coágulo de fibrina [15,87]. Por lo tanto, la activación debe darse en función de la concentración de fibrina. Sin embargo, en la ecuación (6.3) el patrón de fibras es producido por la presencia del término de activación dado en función de la concentración de fibrinógeno. Por esta razón, y para mantener la homogenidad del patrón fibrilar transmitido, el término de activación de tejido granular está dado en función de la concentración de fibrinógeno, considerado además como precursor de la fibrina.

### 6.2.9. Desplazamientos de la Matriz

$$\underbrace{\nabla \cdot \left[ \frac{E}{1+\nu} \left( \epsilon + \frac{\nu}{1-2\nu} \Theta I \right) \right]}_{\text{Elástico}} + \underbrace{\nabla \cdot [\mu_1 \dot{\epsilon} + \mu_2 \dot{\Theta} I]}_{\text{Viscoso}} + \underbrace{\nabla \cdot \left[ \frac{\tau_{C_o} C_o}{1 + \lambda_{C_o} C_o^2} \right]}_{\text{Tracción}} = 0 \quad (6.7)$$

La migración de las células osteogénicas sobre la red de fibras de fibrina causa un desplazamiento neto de las fibras [24]. Este desplazamiento es modelado en función de las propiedades viscoelásticas de la fibrina [115] y descrito implícitamente en función de la deformación local, expresada como  $\epsilon = \frac{1}{2}(\nabla U + \nabla U^T)$  [127]. Por lo tanto, el equilibrio de fuerzas sobre la matriz está dado por la divergencia de los tensores de esfuerzo lineal elástico y viscoso, donde  $E$  y  $\nu$  son el módulo de Young y el módulo de Poisson de la fibrina,  $\mu_1$  y  $\mu_2$  son los coeficientes de Lamé,  $I$  es el tensor unitario y  $\Theta = \nabla \cdot U$  es la dilatación de la matriz. La contribución debido a la tracción ejercida por las células sobre la matriz es representada por la divergencia de una función de saturación celular controlada por el coeficiente de saturación  $\lambda_{C_o}$  y proporcional a la constante de tracción celular individual  $\tau_{C_o}$  [127, 155, 156].

### 6.2.10. Osteogénesis

$$O = \underbrace{[1 - \exp(-\beta_{C_o} C_o - \beta_{Q_o} Q_o)]}_{\text{Recambio}} \underbrace{\left[ \frac{W_U^n}{U^n + W_U^n} \right]}_{\text{Activación}} \quad (6.8)$$

La osteogénesis es representada como una expresión volumétrica de recambio tisular acompañada por un término de activación dado en función de los desplazamientos de la matriz y de un valor umbral de desplazamiento  $W_U$  asociado al máximo desplazamiento permisible para que exista formación de nuevo osteoide [4, 13, 24]. El término de recambio tisular está dado en función del coeficiente  $\beta_{C_o}$  relacionado con la densidad de células osteogénicas y del coeficiente  $\beta_{Q_o}$  relacionado con la concentración de químico osteogénico. Inicialmente, se asume que no existe densidad de células osteogénicas  $C_o(\mathbf{x}, t)$  ni químico osteogénico  $Q_o(\mathbf{x}, t)$  en la interfase hueso-implante dental y por lo tanto el nuevo osteoide  $O(\mathbf{x}, t)$  es igual a cero. Con la variación en la densidad celular y el químico osteogénico, varía el término exponencial y por lo tanto se presenta formación de nuevo osteoide. Nótese que el valor máximo que puede alcanzar  $O(\mathbf{x}, t)$  es la unidad. Por lo tanto, de acuerdo a la dirección del gradiente de concentración de químico osteogénico dado por el patrón espacial de  $C_o(\mathbf{x}, t)$  en función de la rugosidad superficial del implante, y a la presencia del frente migratorio de células osteogénicas dado por el patrón espacial de  $Q_o(\mathbf{x}, t)$  que puede o no colonizar la superficie del implante de acuerdo al tipo de rugosidad superficial considerado, es posible obtener patrones espaciales de formación de nuevo osteoide  $O(\mathbf{x}, t)$  en las direcciones definidas por los procesos de osteogénesis directa y osteogénesis de contacto [24].

A partir de un análisis numérico dimensional, del análisis de la literatura disponible y utilizando resultados reportados por otros modelos matemáticos con enfoque biológico se obtienen los valores de los parámetros del modelo descrito por las ecuaciones (6.1 - 6.8). Una revisión detallada estos parámetros se presenta en el Apéndice E.

### 6.3. Simulación Numérica

#### 6.3.1. Descripción de la Simulación

El modelo propuesto se implementó numéricamente mediante el método de los elementos finitos usando como dominio una malla bidimensional de elementos lineales que reproduce una sección de la interfase entre el borde del hueso y el perfil de rosca de un implante dental (figura 6.1a). La geometría y dimensiones del perfil del implante se obtuvieron a partir de información proporcionada por el fabricante de implantes dentales MIS Technologies Ltd. (Shlomi, Israel). El ancho de la interfase corresponde a observaciones experimentales del espesor de la capa de proteínas que se adhiere a la superficie del implante y del volumen de tejido necrótico causado por el procedimiento de inserción (figura 6.1b) [26, 146].

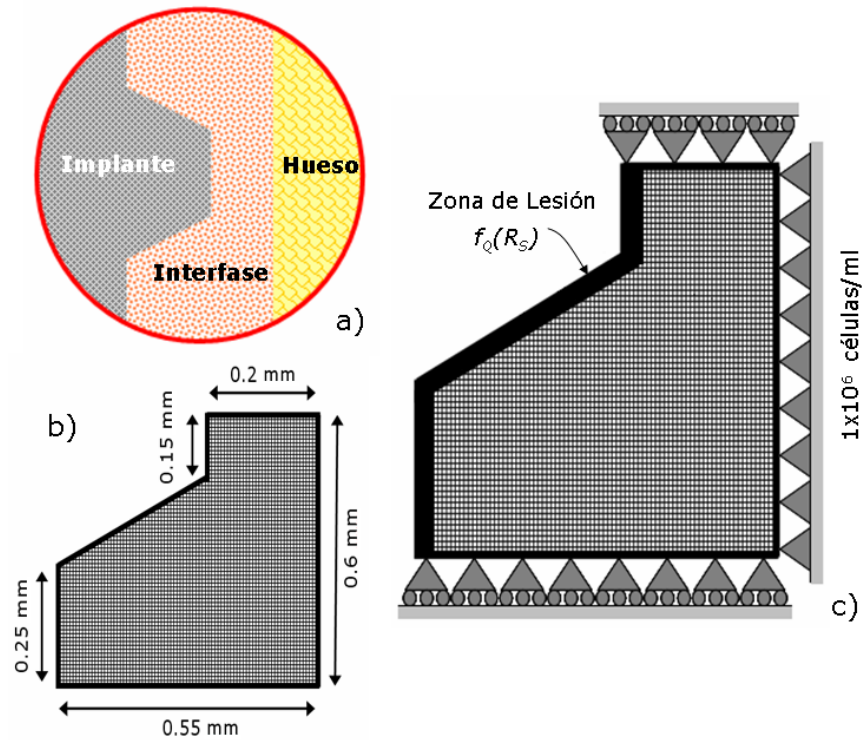


Figura 6.1: a) Esquema del sitio de inserción de un implante dental. b) Diagrama y dimensiones de la sección de interfase usada como dominio bidimensional. c) Condiciones de contorno.

La malla finalmente utilizada consta de 18.728 elementos cuadriláteros bilineales de cuatro nodos para un total de 18.417 nodos. Las condiciones iniciales son cero para las ecuaciones de

fibrina, células osteogénicas, tejido granular, desplazamientos de la matriz y nuevo osteoide. Para las ecuaciones de trombina y fibrinógeno los valores iniciales corresponden a pequeñas perturbaciones del estado estable obtenido mediante el análisis matemático de las ecuaciones de reacción-difusión y el denominado espacio de Turing [122]. Estas perturbaciones espaciales aleatorias son similares las que se presentan interfase, donde existen trazas de las sustancias moleculares debidas a la invasión de sangre y a los remanentes óseo dejados por el procedimiento quirúrgico de inserción [5, 15, 70]. Para la ecuación de químico osteogénico se utiliza como valor inicial  $5 \times 10^{-4}$  mg/ml [33, 65]. Las condiciones de contorno están definidas como se muestra en la figura 6.1c. Para la ecuación de células osteogénicas  $C_o(\mathbf{x}, t)$  se asume una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml [33] en el borde del hueso. Para la ecuación de desplazamientos de la matriz  $U(\mathbf{x}, t)$  se asume rigidez en el borde del hueso y desplazamientos laterales en los bordes superior e inferior de la interfase. Para las ecuaciones de concentración de químico osteogénico  $Q_o(\mathbf{x}, t)$  y osteogénesis  $O(\mathbf{x}, t)$  se define una *zona de lesión* de  $1 \mu\text{m}$  de espesor a partir de la superficie del implante que corresponde a la zona de contacto entre los tejidos en formación y la superficie del implante [146]. De esta forma, en los elementos que componen esta parte del dominio, el término reactivo de la ecuación de químico osteogénico  $Q(\mathbf{x}, t)$  es modificado de la siguiente manera:

$$f_Q = \underbrace{r_{QI}R_s + r_{Q_o}C_o}_{\text{Producción}} - \underbrace{\delta_{Q_o}Q_o - \delta_{QC}C_oQ_o}_{\text{Consumo}} \quad (6.9)$$

En este nuevo término reactivo el aumento en la concentración de químico osteogénico durante la coagulación es reemplazado por un término de producción con coeficiente  $r_{QI}$  en función de la rugosidad superficial del implante  $R_s$ . De esta manera si el implante posee una alta rugosidad se asume que existe una mayor activación de químico osteogénico en las cercanías del implante debido a la mayor activación de plaquetas [60, 157]. Adicionalmente, se asume que en esta zona puede o no formarse nuevo osteoide y por lo tanto las propiedades mecánicas del tejido son variables en función de la rugosidad superficial. Por lo tanto, en los elementos de la zona de lesión el módulo de Young y el módulo de Poisson están dados en función de los siguientes valores:

$$E, \nu = \begin{cases} E_{max} \wedge \nu_{max}, & \text{si } R_S = 1 \\ E_{min} \wedge \nu_{min}, & \text{si } R_S = 0 \end{cases} \quad (6.10)$$

El tiempo de simulación corresponde al tiempo de cicatrización inicial de la interfase hueso-implante dental, es decir, 21 días [23, 75]. Cada una de las etapas de cicatrización es ajustada temporalmente a un intervalo de duración. Por lo tanto, la coagulación tiene una duración de 10 minutos [147], la degradación de la fibrina tiene una duración de 48 horas [15], la migración celular tiene una duración de 5 días [23, 75], la contracción de la matriz de fibrina y la formación del tejido granular una duración de 3 días [15, 16], y la formación de nuevo osteoide una duración de 14 días [23, 75]. El modelo es implementado computacionalmente utilizando el método de los elementos finitos para la discretización espacial y un esquema de diferencias finitas implícito del tipo *Backward Euler* para la discretización temporal. El sistema no lineal resultante se resuelve utilizando el *método de Newton-Raphson*. Una explicación detallada de estos métodos se encuentra en el Apéndice A. La implementación del modelo discretizado se realizó mediante una rutina de usuario programada en Intel Fortran 11 (Intel Corp., USA) que se resuelve utilizando el software de elementos finitos Abaqus 6.6 (Simulia Dassault Systèmes, USA). La solución se obtuvo usando un computador de escritorio con procesador AMD Phenom X4 2.4GHz, 8GB RAM en un tiempo total de seis horas.

### 6.3.2. Casos Analizados

La formación del osteoide sobre la superficie del implante inicia con deposición de una *línea de cementación* que corresponde a una capa de matriz mineralizada no colágena [19]. Esta línea de cementación se invagina, interdigita y entrelaza con la superficie del implante y activa la formación de osteoide colágeno [19]. Sobre la línea de cementación, los osteoblastos diferenciados continúan formando la nueva matriz que luego es mineralizada. En los implantes dentales se ha establecido que las modificaciones superficiales en las dimensiones menores a un micrómetro tiene influencia en la morfología, orientación y adhesión celular [26, 60]. Esta microtopografía proporciona a la superficie del implante un patrón similar al dejado por el frente de resorción de osteoclastos en la superficie del hueso durante el remodelamiento [6, 45]. Este patrón superficial permite que la línea de cementación secretada por los precursores



osteoblásticos se entrelace con la superficie del implante y asegure la formación del nuevo hueso [19]. Además, se ha encontrado que implantes con superficies lisas tienen menor capacidad de retener el nuevo osteoide en comparación con los implantes con tratamientos superficiales [5,9]. Por lo tanto, la línea de cementación se convierte en la frontera que asegura la oseointegración entre el biomaterial y el tejido vivo [24].

Para la evaluación del modelo matemático propuesto se asume inicialmente un implante dental con superficie lisa ( $R_S=0$ ). Esta baja rugosidad disminuye la actividad de las plaquetas y por lo tanto disminuye la liberación de químico osteogénico en las cercanías del implante [24,157]. Además, implica la posible formación de tejido fibroso alrededor del implante en lugar de nuevo osteoide [1,4]. Por esta razón, los elementos del dominio bidimensional pertenecientes a la zona de lesión adquieren propiedades mecánicas con valores mínimos según la ecuación (6.10). Posteriormente se asume un implante dental con rugosidad superficial alta ( $R_S=1$ ). Una superficie de este tipo aumenta la adhesión de plaquetas y por lo tanto el gradiente de químico osteogénico en las cercanías del implante [24,157]. Esto a su vez aumenta la densidad de células osteogénicas en la superficie del implante con lo cual es posible observar osteogénesis de contacto. Una tercera simulación donde se asume un implante con rugosidad superficial media ( $R_S=0.5$ ) permite obtener información comparativa adicional entre los resultados de los dos casos anteriores.

### 6.3.3. Resultados

El modelo que se presenta simula la oseointegración de un implante dental basado en un enfoque mecanobiológico de la cicatrización de la interfase hueso-implante. Esta cicatrización inicia con el sangrado y coagulación causado por la inserción del implante. La figura 6.2 muestra la evolución temporal de la formación del coágulo. En los minutos iniciales de la cicatrización, la reacción cinética entre el fibrinógeno y la trombina inicia la formación de las fibras de fibrina (figura 6.2a) [71]. Después de 10 minutos [147] la interfase hueso-implante dental es gobernada por la red de fibras de fibrina que alcanzan una concentración máxima típica de 2.5 mg/ml [115] (figura 6.2b). Posteriormente, esta red debe ser degradada para permitir el avance del frente de células osteogénicas en un proceso que finaliza hacia el cuarto día de cicatrización [15,76] (figura 6.2c) disminuyendo la concentración de fibrina a un 60% del valor máximo [158].

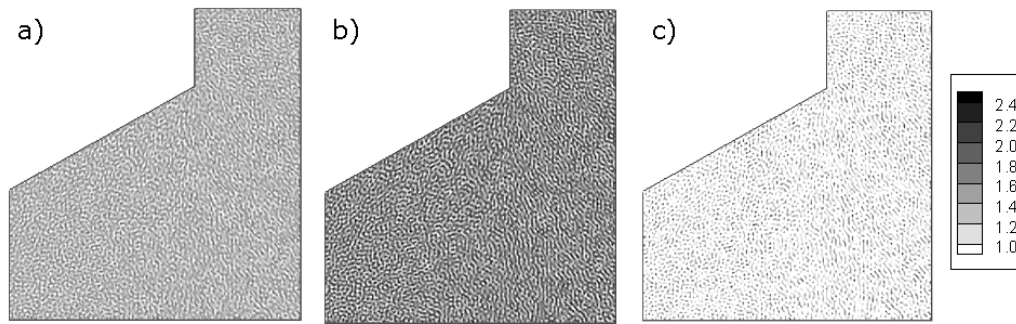


Figura 6.2: Formación del coágulo de fibrina. a)  $t=2$  minutos. b)  $t=10$  minutos. c)  $t=48$  horas.

La apariencia granular que se observa se debe al ancho de las fibras de fibrina que componen el coágulo. Mediante la reducción del dominio a un cuadrado de  $1 \mu\text{m}$  de lado y realizando escalamiento espacial del modelo, se aprecia que el ancho promedio de las fibras de fibrina es de unos  $250 \text{ nm}$  (figura 5.8), resultado que corresponde con mediciones experimentales hechas a fibras de fibrina producidas in-vitro [71, 115, 153].

Una vez que finaliza la formación del coágulo de fibrina inicia la migración celular. La figura 6.3 muestra el patrón de migración de la densidad de células osteogénicas para los tres diferentes grados de rugosidad superficial utilizados. De acuerdo a esto, se observan diferencias en la densidad de células osteogénicas en las cercanías del implante, hecho que está relacionado con la capacidad osteoinductiva de su superficie [24]. En el caso de la superficie con rugosidad baja se observa un patrón de migración celular con un frente de desplazamiento homogéneo (figura 6.3a) que no alcanza a cubrir la totalidad de la interfase al final del cuarto día de cicatrización (figura 6.3b). En particular, se ha encontrado que para este tipo de superficie la migración celular requiere de al menos 7 días para alcanzar la superficie del implante, resultado que corresponde con observaciones experimentales realizadas sobre la velocidad de recuperación tisular en interfases con implantes sin tratamientos superficiales [19, 26].

En el caso de la superficie con rugosidad media se observa un patrón de migración con mayor velocidad que el encontrado para la superficie con rugosidad baja y con un frente de desplazamiento no homogéneo que tiene preferencia por la superficie del implante (figura 6.3c). Al cabo de cuatro días, las células han recorrido la totalidad de la interfase y se han acumulado en las cercanías de la superficie del implante (figura 6.3d). Este mismo mecanismo de migración es observado para la superficie con rugosidad alta, donde la mayor velocidad de

desplazamiento (figura 6.3e) y mayor acumulación de células en las cercanías de la superficie del implante (figura 6.3f) demuestran una mayor osteoinducción de este tipo de superficie con respecto a las dos anteriores. Específicamente se ha encontrado que, al término del tiempo necesario para que la migración celular recorra toda la interfase, la superficie con rugosidad alta aumenta la densidad de células osteogénicas en las cercanías del implante en un 50 % respecto a la superficie con rugosidad baja, mientras que una superficie con rugosidad media lo hace en un 30 %, resultados que corresponden con observaciones experimentales [159].

La migración de células osteogénicas concentradas en la superficie del hueso es activada por la presencia de un gradiente de químico osteogénico [68]. Este gradiente depende de la activación de plaquetas que a su vez depende de la rugosidad superficial del implante [24,157]. La figura 6.4 muestra la concentración de químico osteogénico para cada tipo de superficie analizada. Una rugosidad superficial baja impide que exista activación de plaquetas y por lo tanto un gradiente osteogénico en las cercanías de la superficie del implante. En este caso, la concentración de químico osteogénico es producida únicamente por las mismas células en migración (figuras 6.4a y 6.4b). Por lo tanto, la disminución inicial en la concentración de químico observada en las cercanías del implante en la figura 6.4a se debe a la presencia del término de degradación natural en la ecuación 6.5 que no es compensado por ningún término de producción. No obstante, con la migración y proliferación celular, el término de producción debido a la presencia de células entra en actividad incrementando la concentración de químico osteogénico y compensando la degradación natural, explicándose así el aumento observado en la figura 6.4b.

Por el contrario, las superficies con rugosidades media y alta permiten la activación de plaquetas y la consecuente liberación de químico osteogénico. Esto crea un gradiente de concentración en las cercanías de la superficie del implante (figuras 6.4c-6.4f) un orden de magnitud mayor que la concentración de químico osteogénico producido por las células. Esta diferencia de magnitud entre las dos términos de producción del químico osteogénico explica la aparente ausencia del primero en la figuras 6.4c-6.4f. Además, la presencia de gradientes de concentración debidos a la activación plaquetaria y la magnitud de estos gradientes explican las variaciones de velocidad del frente osteogénico y la acumulación de células en las cercanías del implante respecto a cada tipo de superficie observadas en la figura 6.4, resultados que

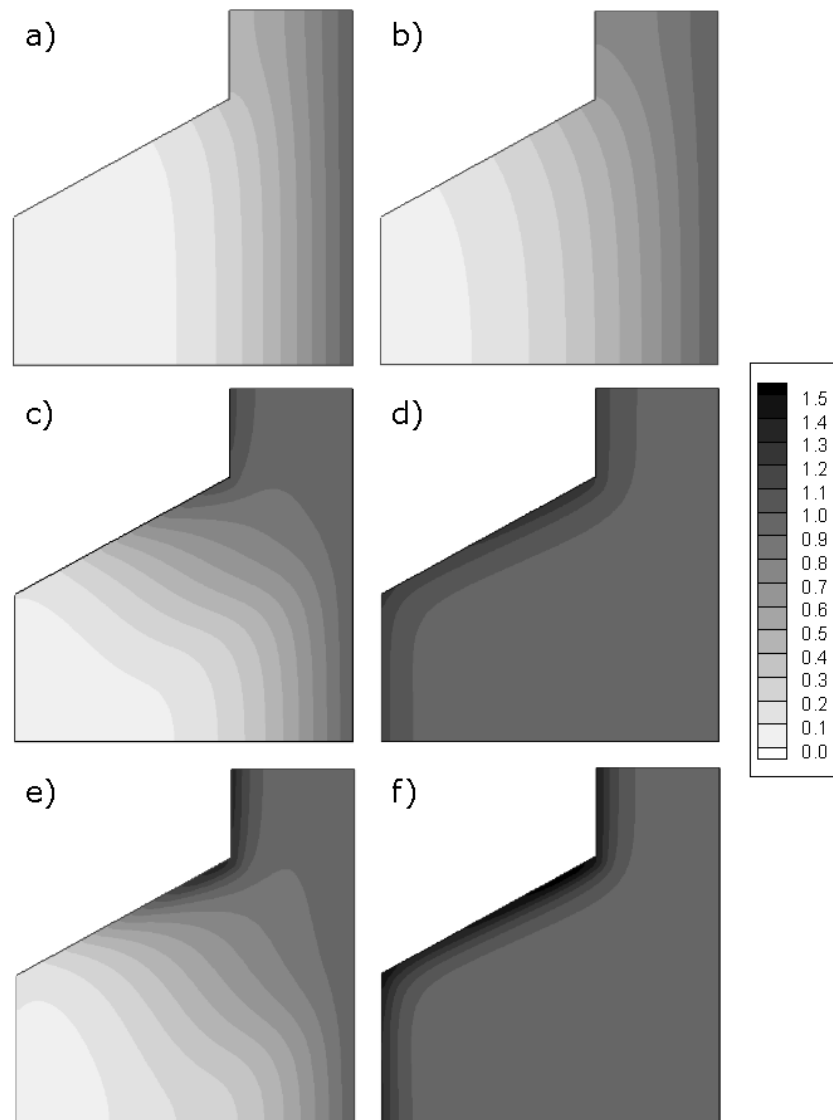


Figura 6.3: Densidad de células osteogénicas normalizada (en células/ml). Izquierda:  $t = 5$  días. Derecha: 7 días. a) y b) Rugosidad baja. c) y d) Rugosidad media. e) y f) Rugosidad alta.

concuerdan con observaciones experimentales previamente reportadas [19, 24, 159].

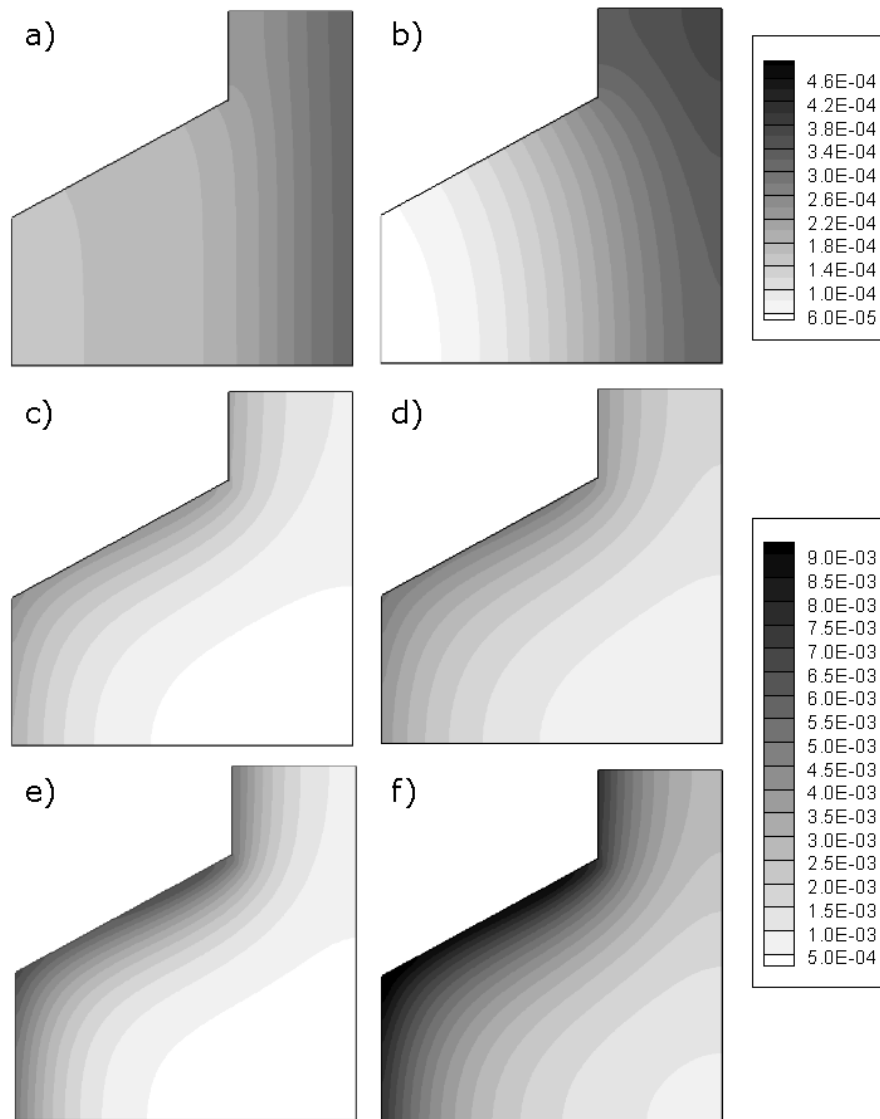


Figura 6.4: Concentración de químico osteogénico (en mg/ml). Izquierda:  $t = 5$  días. Derecha:  $t = 7$  días. a) y b) Rugosidad baja. c) y d) Rugosidad media. e) y f) Rugosidad alta.

Con la migración celular inicia el proceso de recambio del coágulo por tejido granular. La figura 6.5 muestra el avance del tejido granular como un frente de onda homogéneo. Esta formación inicia hacia el cuarto día de cicatrización (figura 6.5a), alcanza la mitad de la interfase hacia el quinto día (figura 6.5b) y completa el recambio de la matriz de fibrina hacia el sexto día de cicatrización (figura 6.5c). Como el tejido granular se crea lo largo de las fibras

de fibrina, el recambio adopta el mismo patrón granular mostrado en la figura 6.2.

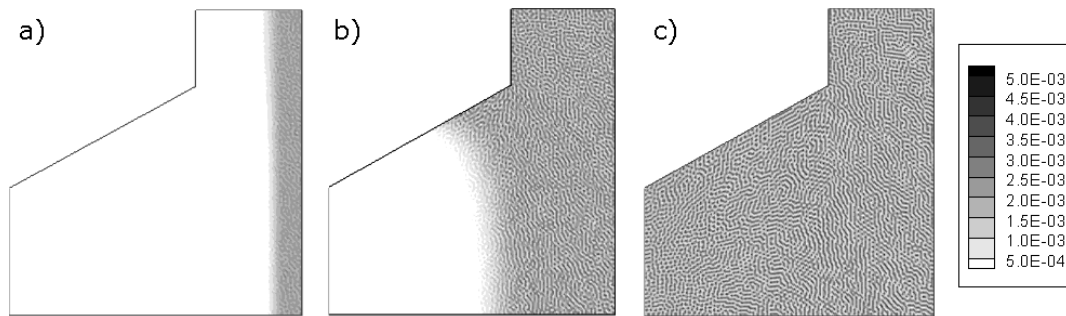


Figura 6.5: Densidad de tejido granular (en mg/ml) a)  $t=4$  días b)  $t=5$  días. c)  $t=6$  días.

Adicionalmente, la migración celular causa desplazamientos de las fibras de fibrina de manera que aquellas fibras adheridas a la superficie del implante pueden ser separadas [19,24]. Esta separación puede evitarse si el implante posee irregularidades superficiales de dimensiones similares al orden de magnitud de los desplazamientos [21]. En el caso de un implante con rugosidad baja, la ausencia de irregularidades superficiales causa que los desplazamientos de la matriz de fibrina aumenten homogéneamente a medida que las células osteogénicas se acercan a la superficie del implante (figura 6.6a). Por lo tanto, en la denominada zona de lesión (figura 6.1), la mayor magnitud en los desplazamientos indica la separación de las fibras y la creación de una brecha que impide la colonización del implante por los tejidos en formación [4,13]. Por su parte, la presencia de irregularidades superficiales con rugosidades media y alta aumenta la capacidad adhesiva de las fibras [26,60]. Esta mayor adhesión se traduce en un menor desplazamiento de la red fibrilar (figuras 6.6b y 6.6c) que a su vez es compensado por las dimensiones de las irregularidades superficiales que evitan la aparición de la brecha entre la superficie del implante y las fibras que sostienen el frente de recambio tisular.

Por otro lado, es evidente que la diferencia en la densidad celular y concentración de químico osteogénico entre los tres tipos de superficies analizados modifica el perfil de consolidación ósea y por lo tanto la oseointegración del implante. Este hecho queda en evidencia a partir de los resultados obtenidos para la formación de nuevo osteoide mostrados en la figura 6.7. En el caso de la superficie con rugosidad baja, la ausencia de irregularidades superficiales y por lo tanto la baja osteoinducción de la superficie evita su colonización celular. Esto deriva en un

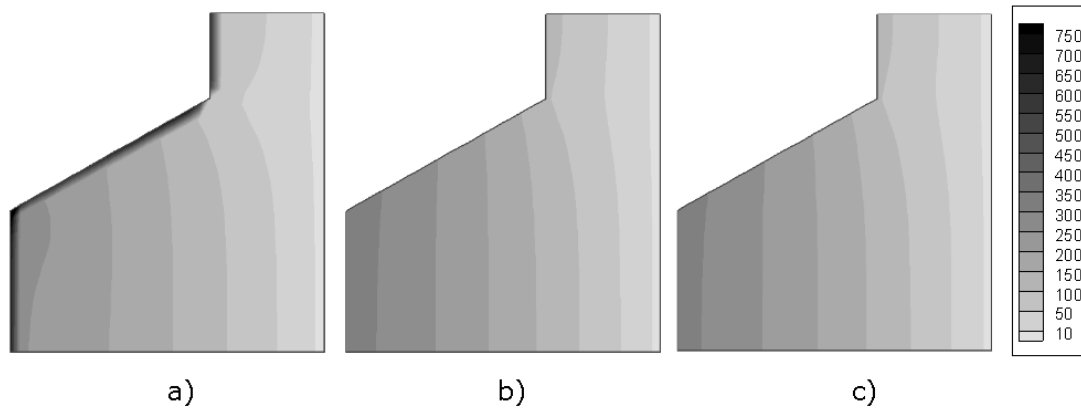


Figura 6.6: Desplazamientos de la matriz de fibras de fibrina (en  $\mu\text{m}$ ). a) Rugosidad baja. b) Rugosidad media. c) Rugosidad alta.

perfil de formación de nuevo osteoide homogéneo en la interfase que corresponde únicamente al proceso de osteogénesis directa (figuras 6.7a-6.7c). La baja velocidad de este único frente de formación de nuevo osteoide causa que al cabo de 21 días de cicatrización la osteogénesis aún no haya alcanzado completamente la superficie del implante (figura 6.7c), lo cual concuerda con observaciones experimentales sobre la calidad del nuevo hueso en las cercanías de este tipo de superficie [1, 4].

Por el contrario, la presencia de irregularidades superficiales en las superficies con rugosidad media y alta fomenta la colonización celular de la superficie del implante y por lo tanto la formación de nuevo hueso obedece tanto al fenómeno de osteogénesis directa como al de osteogénesis de contacto (figuras 6.7d - 6.7i). En estos casos, la aparición de un frente de osteogénesis de contacto con menor velocidad de deposición que el frente de osteogénesis directa elimina la homogeneidad del patrón de formación de nuevo osteoide en la interfase pero garantiza la colonización de la superficie del implante por parte del proceso osteogénico (figuras 6.7d y 6.7g). Nótese que en ambos casos la mayor magnitud se encuentra concentrada en las cercanías del implante, lo que demuestra la mayor actividad osteoinductiva, osteoconductiva y osteogénica de estas superficies (figuras 6.7f y 6.7i). Finalmente, los niveles de volumen de nuevo osteoide alcanzados luego de 8, 14 y 21 días son comparables entre las superficies con rugosidad media y alta aunque con diferencias de 10-15 %.

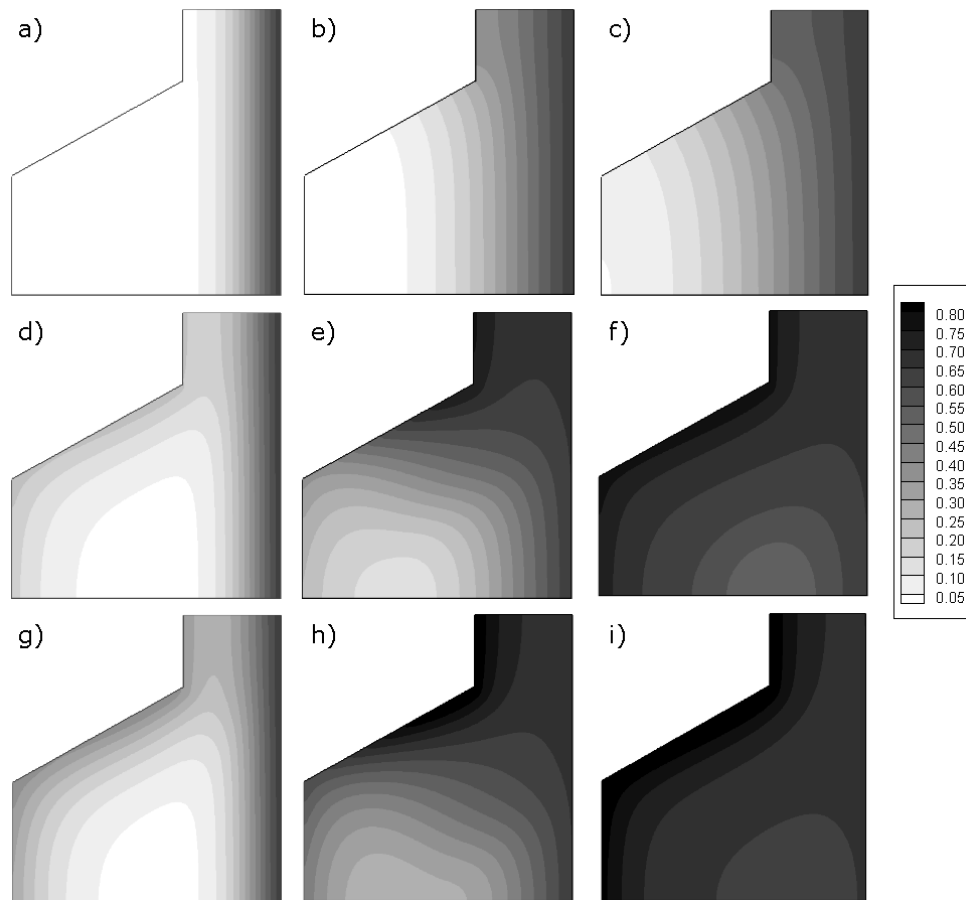


Figura 6.7: Volumen de nuevo osteoide (en %). Izquierda:  $t=8$  días. Centro:  $t=14$  días. Derecha:  $t=21$  días. a-c) Rugosidad baja. d-f) Rugosidad media. g-i) Rugosidad alta.

## 6.4. Discusión

El objetivo de este trabajo es presentar un modelo matemático de la recuperación tisular en la interfase hueso-implante dental que precede a la oseointegración del implante. El modelo está basado en dos suposiciones. La primera establece que el proceso de cicatrización de la lesión causada por la inserción del implante dental sigue una serie de etapas secuenciales definidas por intervalos de tiempo [15,17,69]. De esta manera, se han definido cuatro etapas de cicatrización bien establecidas (figura 3.1) [15,23,75] que al ser implementadas computacionalmente permiten obtener la distribución de patrones espacio-temporales en una sección de la interfase hueso-implante dental. Estos patrones describen la coagulación de la sangre y formación de la red de fibrina (figura 6.2), la migración de células osteogénicas y colonización de la superficie del implante (figuras 6.3 y 6.4), la formación de tejido granular (figura 6.5),



los desplazamientos ejercidos por la migración celular sobre la red de fibrina (figura 6.6), y la formación de nuevo osteoide (figura 6.7). Este enfoque complementa modelos matemáticos relacionados con la cicatrización de la interfase hueso-implante dental [33, 154] al considerar como primera etapa del proceso de cicatrización la coagulación de la sangre. La inclusión de esta etapa de cicatrización permite no sólo modelar la formación de la matriz de fibrina que brinda soporte a la migración celular sino también incluir en la descripción matemática la concentración de plaquetas como activadoras de esta migración [24, 157]. Estas características permiten además que el modelo se adapte a diferentes concentraciones de plaquetas de manera que las configuraciones de la red de fibrina sean ajustables de acuerdo a diferentes tipos de condición biológica, hecho que ha sido ampliamente analizado en el capítulo 5 [160].

La segunda hipótesis está relacionada con el enfoque mecanobiológico utilizado y la influencia de la superficie del implante en la consolidación de la oseointegración. La mayoría de los modelos matemáticos de implantes dentales se han desarrollado como herramientas para evaluar el diseño de un implante, la influencia de las cargas externas en la estabilidad mecánica tanto del hueso como del implante, y el perfil de distribución de esfuerzos en la interfase hueso-implante dental, la mayoría de las veces, considerada completamente oseointegrada [30, 31, 47]. En estos modelos los factores biológicos no son utilizados y variaciones en los factores mecánicos determinan la viabilidad de la interfase y posterior oseointegración del implante [31]. Sin embargo, en este nuevo enfoque que se presenta la combinación de factores biológicos y mecánicos permite que variaciones en los factores mecánicos modifiquen la respuesta biológica.

Con esto, la viabilidad de la interfase y oseointegración del implante están determinadas por un adecuado balance entre los procesos biológicos de recuperación tisular y la actividad de los factores mecánicos sobre estos procesos biológicos [5, 6, 15, 18, 25]. Este hecho se observa específicamente al analizar los desplazamientos causados por la migración celular. A partir del enfoque combinado utilizado se ha podido establecer numéricamente que en implantes con rugosidad superficial baja las fibras de fibrina que se encuentran en contacto con la superficie del implante experimentan mayores desplazamientos que en el caso de un implante con rugosidad superficial media o alta (figura 6.6). Esto concuerda con observaciones experimentales en las cuales implantes dentales con superficies libres de irregularidades superficiales son encapsulados por tejido fibroso en lugar de nuevo hueso [1, 3, 48]. Este tejido fibroso posee menos

vasculatura y presenta síntomas de inflamación que causan la pérdida del implante ya que impide la llegada de las células osteogénicas a su superficie [4, 13].

En el modelo, la formación de tejido fibroso en implantes con rugosidad superficial baja es considerada como un cambio en las propiedades mecánicas de la matriz de fibrina en función de la rugosidad superficial (ecuación 6.10). De esta manera, la ausencia de irregularidades superficiales causa mayores desplazamientos de la matriz de fibrina en las cercanías del implante que derivan en la separación de éstas de la superficie del implante (figura 6.6a) [24]. Esta separación supone la aparición de una brecha entre el hueso y el implante que es luego ocupada por tejido fibroso [4].

Por el contrario, se ha logrado establecer numéricamente que la presencia de irregularidades superficiales disminuye la pérdida de fibras de fibrina adheridas a la superficie del implante por acción de la migración celular si se considera que estas irregularidades tienen el mismo orden de magnitud que los desplazamientos. Es decir, aunque la presencia de irregularidades superficiales no impide los desplazamientos de las fibras de fibrina (figuras 6.6b y 6.6c), las dimensiones de éstas irregularidades hacen que las fibras desplazadas permanezcan aún en las cercanías del biomaterial. Es bien sabido que las células osteogénicas al diferenciarse en osteoblastos inician la síntesis de nuevo osteoide en forma de unidades circulares organizadas denominadas *osteonas* [25]. Como el diámetro exterior de una osteona es de 200  $\mu\text{m}$  [104] y las irregularidades superficiales de un implante dental típicamente son del orden de 1-100  $\mu\text{m}$  [19, 26] es válido suponer que la distancia entre las fibras de fibrina desplazadas y las irregularidades de la superficie del implante es salvable a medida que el frente de células osteogénicas forma osteonas. Por lo tanto, la presencia de desplazamientos en este tipo de superficies es compensada con las irregularidades superficiales siendo entonces posible la deposición de nuevo osteoide en la superficie del implante (figuras 6.7f y 6.7i). Este resultado concuerda con observaciones experimentales según las cuales la presencia de irregularidades superficiales aumenta la adhesión de células y moléculas [19, 26] que incrementan la conexión de las fibras de fibrina a la superficie del implante y evitan su separación conforme el frente osteogénico se desplaza sobre ellas [60].

Con la descripción e implementación secuencial del proceso biológico de recuperación tisular y la inclusión del proceso mecánico de contracción y la superficie del implante dental se ha

logrado obtener un nuevo modelo matemático que permite predecir la respuesta osteoinductiva de la superficie del material a partir de la activación de plaquetas y la conformación de un gradiente de químico osteogénico en las cercanías del implante (figura 6.4). Esta respuesta osteoinductiva se complementa con la capacidad osteoconductiva de la superficie según se observa en la densidad de células osteogénicas que colonizan la superficie del implante (figura 6.3). Por lo tanto, el modelo permite predecir, en función de la osteoinducción y la osteoconducción, la formación de nuevo osteoide en la interfase hueso-implante a partir de los procesos de osteogénesis directa (figura 6.7c) y osteogénesis de contacto (figuras 6.7f y 6.7i). De esta manera, es evidente que diferencias en etapas tempranas de la recuperación tisular respecto al tipo de superficie de implante (figuras 6.3 y 6.4) condicionan la formación de nuevo hueso en la interfase hueso-implante dental, formación que es a su vez altamente dependiente del balance existente entre las irregularidades superficiales del implante y los desplazamientos de la matriz de fibrina (figuras 6.6 y 6.7).

No obstante, se debe admitir que el modelo es sólo una aproximación a la realidad del proceso de oseointegración de la interfase hueso-implante dental y por lo tanto existen una serie de limitaciones asociadas al enfoque utilizado. La primera limitación consiste en la simplificación del entorno mecanobiológico en la interfase hueso-implante dental. Desde el punto de vista biológico, se ha preferido simplificar la cadena de eventos moleculares que culminan con la formación del coágulo de fibrina en la reacción cinética entre el fibrinógeno y la trombina, también conocida como *vía común de la coagulación* [70], con lo cual una amplia serie de moléculas y proteínas presentes en la sangre han sido despreciadas [68, 70]. Así mismo, con la implementación de la ecuación de densidad de células osteogénicas y la ecuación de concentración de químico osteogénico se simplifica la descripción de los diferentes tipos de células y factores de crecimiento que intervienen en el proceso de recuperación tisular.

Estas simplificaciones de la realidad biológica del problema, aunque permiten reproducir aspectos generales de la cicatrización de la interfase hueso-implante impiden el análisis de características particulares como la actividad de los macrófagos y la diferenciación de las células madre en pericitos, fibroblastos, mioblastos y osteoblastos [15,16]. Por su parte, aunque el uso de los factores mecánicos de contracción representa una novedad de este modelo frente a otros similares, la simplificación hecha a los factores de adhesión y activación impide el análisis de los efectos de carga a nivel celular. Un análisis de este tipo permite incluir la respuesta

mecanotransductiva de células y tejidos así como la activación de mecanismos de señalización mecano-inducidos [18, 96].

La segunda limitación está relacionada con las condiciones iniciales. Si bien estas condiciones fueron obtenidas de las concentraciones promedio reportadas en la literatura, la influencia de mecanismos biológicos no contemplados en la descripción implementada modifica los valores utilizados. Específicamente, la activación preliminar de múltiples moléculas en las denominadas vías intrínsecas y extrínsecas de la coagulación [68, 70] condiciona la activación de la vía común al modificar las concentraciones iniciales de fibrinógeno, trombina y fibrina [71, 134]. Por su parte, los restos de hueso dejados por el procedimiento de inserción del implante condicionan la densidad inicial de células osteogénicas ya que éstas eventualmente no están confinadas a la superficie del hueso circundante [79]. Además, la presencia y activación inicial de plaquetas y de otras moléculas con carácter osteogénico no consideradas en el modelo varían la concentración inicial de químico osteogénico por lo cual es posible que se formen gradientes secundarios que modifiquen el perfil de migración celular [17].

La tercera limitación está relacionada con las condiciones de contorno. Asumir el flujo de sangre igual a cero en el tiempo cero supone la formación de un coágulo inicial que detiene la pérdida de sangre y confina la sangre infiltrada a la interfase hueso-implante dental. Este coágulo inicial supone no sólo la activación previa de las plaquetas sino también la activación del proceso de vasoconstricción de los vasos sanguíneos averiados [68], efecto que no ha sido considerado en el modelo. Por su parte, los soportes aplicados a la sección de interfase utilizada como dominio bidimensional no necesariamente deben ser como se muestra en la figura 6.1. En ella, el desplazamiento en el contorno está restringido a la dirección horizontal. Nótese que en la ecuación de densidad celular (ecuación 6.4) no se tiene en cuenta la diferenciación celular, en parte, debido a que todos los tipos de células presentes durante la cicatrización de la interfase se han simplificado en un único contingente celular. Sin embargo, la diferenciación celular deriva en grupos de células que eventualmente presentan respuesta negativa ante la presencia del gradiente de químico osteogénico [17, 67]. Es decir, pueden existir células tendientes a evitar el gradiente de químico osteogénico que en su intento por alejarse de él causan desplazamientos en la dirección vertical de la interfase que alteran el patrón homogéneo mostrado en la figura 6.6 [16, 17, 69].

Un cuarta limitación tiene que ver con el hecho de considerar la superficie del implante como un parámetro numérico. Aunque en el modelo se hace referencia a tres tipos de rugosidades superficiales, no existe ninguna relación entre el valor del parámetro  $R_S$  y la rugosidad superficial de un implante dental. No obstante, una relación de este tipo puede encontrarse si se correlacionan las rugosidades promedio ( $R_a$ ) de diferentes superficies de implantes dentales con los procesos electroquímicos de tratamiento y recubrimiento superficial [26, 159] y las características morfológicas de las irregularidades superficiales [19, 41].

En quinto lugar, los parámetros del modelo fueron algunos estimados de la literatura disponible, otros fueron estimados a partir de resultados experimentales y otros fueron tomados directamente de trabajos numéricos previamente reportados. Sin embargo, el valor exacto de muchos de ellos es desconocido siendo por lo tanto necesario ajustarlos de manera que la formación de los patrones espacio-temporales sea la esperada (Apéndice E). La dificultad para obtener los valores adecuados a partir de pruebas experimentales es una debilidad que comparte el modelo con otros trabajos en el área del modelado computacional de fenómenos biológicos. Un acercamiento experimental utilizando técnicas de cultivo celular sobre diferentes tipos de superficies de implantes dentales (mostrado en el siguiente capítulo) permitió obtener parámetros correlacionados con la variable osteogénica del modelo ( $O(\mathbf{x}, t)$ ). Sin embargo, estos parámetros no corresponden directamente con las variables del modelo en tanto realizar experimentos dedicados a la observación y cuantificación de la actividad celular y molecular es complejo y carece de fundamento desde el punto de vista experimental. Por lo tanto, las propiedades predictivas de los modelos matemáticos deben justificar y a la vez proponer líneas de trabajo experimental orientadas a la obtención de información complementaria para los procesos biológicos y mecánicos utilizados en las descripciones matemáticas. No obstante, se debe destacar que los valores hallados numéricamente se pueden correlacionar con otros encontrados en trabajos experimentales, lo cual hace que el modelo sea viable desde el punto de vista biológico.

A pesar de estas limitaciones, el modelo presentado puede considerarse como un avance en el modelado computacional de la oseointegración de implantes dentales en especial por la combinación de los factores biológicos, los factores mecánicos y la superficie del implante. Aunque la complejidad del proceso mecanobiológico de oseointegración ha llevado a la implementación de una versión simplificada del fenómeno, los resultados obtenidos demuestran que

el modelo puede ser utilizado como base metodológica para la creación de un herramienta de predicción del grado de oseointegración de un implante dental de acuerdo a las características del paciente, la anatomía y fisiología del hueso mandibular, el diseño del implante dental y el procedimiento quirúrgico utilizado para insertar el implante [5, 6, 41, 55]. Finalmente, se concluye que este modelo puede ser ampliado en trabajos futuros para formular modelos adicionales orientados a la predicción de la cicatrización de otro tipo de lesiones y a la evaluación del comportamiento mecanobiológico de otros dispositivos implantables.

## CAPÍTULO 7

# INTERACCIÓN ENTRE OSTEÓBLASTOS Y SUPERFICIES DE TITANIO: APLICACIÓN EN IMPLANTES DENTALES

### 7.1. Introducción

Varios estudios se han realizado para evaluar la biocompatibilidad de diferentes materiales de uso común en la fabricación de implantes dentales [36, 52]. Se ha reportado que el titanio es el mejor material a escoger debido a su alta resistencia a la corrosión causada por el ambiente fisiológico y su estabilidad mecánica durante todo el proceso de cicatrización [13, 50]. Se ha encontrado además que el niobio, el tantalio, el circonio, el vanadio, el aluminio y el molibdeno son los materiales más favorables para ser usados en aleaciones de titanio con fines biomédicos [53]. Aunque estas aleaciones no son tóxicas y son altamente inertes [50, 53], muchas de ellas no establecen una fuerte conexión con los tejidos circundantes y pueden llegar a inducir la formación de tejido fibroso en lugar de tejido óseo [26]. Para evitar esto, las superficies de los implantes dentales son expuestas a tratamientos superficiales que crean patrones en la superficie metálica del biomaterial en la escala micro y sub-micrométrica. Estos patrones aumentan la retención de moléculas presentes en la interfase hueso-implante dental que conducen a un aumento en el grado de formación de los nuevos tejidos. Adicionalmente, el uso de recubrimientos con minerales inorgánicos mejoran la capacidad osteogénica de la superficie del implante con lo cual su osteoconducción es similar a la de una superficie ósea real [19, 21].

Una adecuada morfología superficial permite que las células osteogénicas se adhieran y proliferen sobre la superficie del implante [21], creando depósitos de mineral que constituyen la base de la formación del nuevo hueso [24,25]. Por lo tanto, las estrategias que modifican la superficie del implante conducen a implantes con mejor respuesta osteoinductiva y osteoconductiva, y a tasas de deposición de hueso más elevadas que resultan en una oseointegración completa [19]. Comercialmente, existe una amplia variedad de superficies en implantes dentales [19,20,24,26,161], muchas de las cuales poseen una comprobada eficiencia clínica [20,161]. Sin embargo, varios de los mecanismos por los cuales una superficie es viable para su uso en implantes dentales son aún motivo de investigación [26]. Debido a esto, la validación de nuevas superficies está basada en pruebas experimentales usando técnicas de cultivo celular y modelos animales que en ningún caso han sido estandarizados [161,162]. Por lo tanto, el estudio comparativo de diferentes superficies es la manera más acertada para realizar una evaluación formal del comportamiento de diferentes tratamientos superficiales y recubrimientos [20], metodología que curiosamente no es muy común en la literatura [161]. En este capítulo se muestra el estudio realizado a cuatro diferentes tipos de superficies de implantes dentales mediante ensayos de adhesión celular, proliferación celular y biomineralización utilizando técnicas de cultivo celular. Los resultados permiten obtener conclusiones sobre el comportamiento de cada una de las superficies en un ambiente similar al fisiológico y determinar cuál de ellas tiene mejor respuesta en términos de las propiedades osteoinductiva y osteoconductiva. En la siguiente sección se describen las técnicas usadas en este estudio. Luego se muestran los resultados y se realiza su discusión. Finalmente se presentan las conclusiones obtenidas y algunas líneas de trabajo futuro.

## 7.2. Materiales y Métodos

### 7.2.1. Sustratos

En este estudio se emplearon como sustratos 120 discos de Ti-6Al-4V con 15 mm de diámetro y 2 mm de espesor. Estos sustratos se dividieron en cuatro grupos de acuerdo a su morfología superficial: (1) maquinado, (2) superficie tratada con chorro de arena y grabado ácido (SBAE), (3) superficie recubierta con hidroxiapatita (HA) y fosfato tricálcico (TCP), y (4) superficie recubierta con TCP y tratada con grabado ácido (TCP+ácido). Todos los sustratos



fueron proporcionados por MIS Technologies Ltda. (Shlomi, Israel). La superficie maquinada se obtuvo utilizando un dispositivo de corte y pulido. La rugosidad y micro geometría de la superficie SBAE se obtuvo por la acción abrasiva de partículas de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (300-400  $\mu\text{m}$ ) seguidas de grabado con  $\text{HCl}/\text{H}_2\text{SO}_4$ . La superficie TCP se obtuvo por abrasión de partículas de HA/TCP (200-400  $\mu\text{m}$ ). La superficie TCP+ácido se obtuvo mediante abrasión con partículas de HA/TCP (200-400  $\mu\text{m}$ ) y limpieza con  $\text{HNO}_3$ .

Luego de su fabricación, los sustratos fueron esterilizados usando radiación gamma y empacados al vacío en un ambiente limpio. Antes de ser utilizados en los experimentos descritos más adelante, los sustratos fueron distribuidos en porta muestras para cultivo celular de 24 pozos (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA). Estos porta muestras fueron expuestos a radiación UV durante 12 horas y luego autoclavados a 120 °C durante 6 horas.

### 7.2.2. Caracterización de Superficies

La caracterización de la morfología superficial de cada tipo de sustrato se realizó de dos formas. Primero, utilizando un microscopio de estereo zoom tipo Zeiss Stemi SV11 con un lente de magnificación de 4x, y con la ayuda de una cámara de acople tipo Zeiss AxioCam MRC5. De esta forma se obtuvieron imágenes (2.0 x 1.5 mm de campo visual) de la macro estructura de las superficies. Luego, utilizando un microscopio electrónico de barrido SEM tipo LEICA Stereo Scan 440 a 20 KV se obtuvieron imágenes de la micro estructura de las superficies a una escala de 10  $\mu\text{m}$ .

### 7.2.3. Cultivo Celular

Para el cultivo celular se obtuvieron células osteoblásticas derivadas de cementoblastoma mediante una técnica convencional de explante y caracterizadas según ha quedado reportado en otros artículos [162,163]. Durante este procedimiento se siguieron las consideraciones éticas aprobadas por la Comisión de Revisión Interna de la Escuela de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México [162]. Las células fueron cultivadas en frascos para cultivo de 75  $\text{cm}^2$  con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 % y una solución de antibiótico compuesta por 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomina

y 100 U/ml de penicilina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Las células fueron incubadas a 37 °C en un ambiente con 95 % de aire y 5 % de CO<sub>2</sub>. En todos los ensayos se utilizaron células del segundo pasaje.

#### 7.2.4. Adhesión Celular

Tres muestras de cada uno de los cuatro tipos de sustrato fueron usados en este ensayo. Para este ensayo las células fueron sembradas e incubadas durante 24 horas en 500  $\mu$ l de medio de cultivo bajo condiciones estándar, como se describió anteriormente. Luego de la incubación, las células sin adherir al sustrato fueron retiradas mediante cuatro lavados con agua estéril. Las células que permanecieron adheridas al sustrato fueron fijadas y teñidas con 300  $\mu$ l de una solución compuesta por 0.1 % de azul de toluidina y 3.54 % de paraformaldehído [164, 165]. Luego de 24 horas a temperatura ambiente, 100  $\mu$ l del sobrenadante fueron usados para medir la absorción óptica a 630 nm mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), esto debido a que el número de células adheridas al sustrato es proporcional a la absorbancia de las muestras experimentales a 630 nm [166].

#### 7.2.5. Proliferación Celular

Tres muestras de cada uno de los cuatro tipos de sustrato fueron utilizados en este ensayo. La proliferación de las células osteoblásticas es determinada mediante el ensayo MTT. Este ensayo está basado en la habilidad de las dehidrogenasas mitocondriales para oxidar el tiazol azul (MTT), una sal de tetrazolio (bromuro de 3-(3,5-di- metiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), en formazán azul [165]. Para este ensayo, las células fueron sembradas de forma similar al ensayo de adhesión e incubadas durante 1, 2, 5, 6 y 7 días. Diariamente se agregó medio fresco y anticuerpo (500  $\mu$ l) a los cultivos. Al final de cada término, las células fueron incubadas con 60  $\mu$ l de MTT a 37°C durante 4 horas. Luego, se removió el sobrenadante y se agregaron 250  $\mu$ l de dimetil sulfóxido (DMSO) a cada pozo. Luego de 30 minutos de incubación, se midió la absorbancia a 570 nm. Debido a que la generación de formazán azul es proporcional a la actividad de las dehidrogenasas, la disminución en la absorbancia a 570 nm proporciona una medida directa de la tasa de proliferación [167].

### 7.2.6. Actividad de la Fosfatasa Alcalina

La fosfatasa alcalina es una enzima característica del linaje osteogénico que participa en la mineralización de la matriz extracelular posiblemente mediante la regulación de las concentraciones extracelulares de compuestos de fósforo [66,92]. Para determinar su actividad, las células fueron cultivadas en 500  $\mu\text{l}$  de medio DMEM suplementado con 10 % de SFB con solución de antibiótico, 10 mM de  $\beta$ -glicerofosfato, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ácido ascórbico, y  $10^{-7}\text{M}$  de dexametasona. Los cultivos fueron incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 5 y 15 días, y diariamente se les agregó medio fresco y anticuerpo (500  $\mu\text{l}$ ) [168]. La actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) se obtuvo siguiendo el protocolo descrito por Lowry y demás [169]. Al final de cada término, se retiró el sobrenadante y las capas celulares fueron extraídas agregando 300  $\mu\text{l}$  de solución ALP a cada pozo. La solución ALP está compuesta por 10 mM de buffer Tris-HCL, pH 7.4, con 0.1 % de Triton X-100. Luego de sonicar, la actividad enzimática fue evaluada usando 10 mM de disodio-p-nitrofenilfosfato como sustrato y 0.25 mM de  $\text{MgCl}_2$  in 0.1M de Tris-HCl buffer, pH 9.8, con 1 M de dietanolamina, e incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. La reacción se detuvo agregando 50  $\mu\text{l}$  de 3M NaOH y se midieron las absorbancias a 405 nm. El ensayo se realizó por triplicado luego de 10 minutos de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$ . La concentración de proteína fue determinada de acuerdo al ensayo de Bradford usando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar [170]. Tres muestras de cada uno de los cuatro tipos de sustrato fueron usados para el ensayo tras 5 días de incubación y dos muestras para el ensayo tras 15 días de incubación.

### 7.2.7. Biomineralización

Para el ensayo de biomineralización se utilizaron dos muestras de cada uno de los cuatro tipos de sustratos. Las células fueron cultivadas bajo las mismas condiciones que en la evaluación de la actividad de la fosfatasa alcalina. De igual manera, la biomineralización fue evaluada después de 5 y 15 días de cultivo. Luego de cada término, el sobrenadante fue removido y las células fueron deshidratadas usando etanol. Posteriormente, las muestras fueron cubiertas con alizarina roja, pH 4.1, y mantenidas a temperatura ambiente durante 24 horas. La tinción con alizarina roja es una técnica histoquímica muy utilizada para detectar depósitos de calcio debido a que tiñe los cristales de calcio creados durante el proceso de biomineralización [171].

Una vez teñidas, las muestras fueron lavadas cinco veces con SFB para eliminar el exceso de alizarina roja. Los cristales teñidos fueron caracterizados usando un microscopio de estereo zoom (Zeiss Stemi SV11). Para el caso de las superficies TCP y TCP+ácido los cristales también fueron observados usando un microscopio electrónico de barrido (LEICA Stereo Scan 440). Los cristales coloreados fueron cuantificados digitalmente usando el software ImageJ (National Institutes of Health, EUA) mediante el cual se obtuvo el porcentaje del total del área de la imagen que contiene deposición de mineral. Para este análisis fueron usadas dos imágenes de estereo zoom tomadas tras 5 y 15 días de cultivo por cada uno de los cuatro tipos de sustrato.

### 7.2.8. Análisis Estadístico

Los datos obtenidos mediante los ensayos descritos fueron evaluados usando un valor  $p$  para evaluar la significancia estadística para un nivel de  $p < 0.05$ . Los estadísticos fueron realizados a través de la herramienta Student's t-test presente en el programa SigmaStat V3.5 (Systat Software, Richmond, CA, EUA).

## 7.3. Resultados

### 7.3.1. Morfología Superficial

La morfología superficial de los cuatro tipos de sustrato fue caracterizada usando microscopio de estereo zoom y SEM. En la superficie maquinada a macro escala se observan estructuras onduladas radiales e igualmente espaciadas creadas durante los procesos de cortado y pulido empleados en la fabricación del sustrato (figura 7.1A). Las imágenes obtenidas usando SEM muestran el perfil ondulado y paralelo de estas estructuras a escala micrométrica (figura 7.1B). En la superficie SBAE la observación a macro escala mediante estereo zoom revela una superficie con perfil granular (figura 7.1C). A escala micrométrica, estos gránulos aparecen como estructuras superficiales de tipo “pico y valle” debido al proceso abrasivo utilizado durante la fabricación del sustrato (figura 7.1D). En el caso de la superficie TCP se encontraron irregularidades con bordes y cortes como en la superficie SBAE (figuras 7.1E y

figura 7.1F). Finalmente, la observación de la superficie TCP+ácido muestra la más compleja de las texturas superficiales. Usando estereo zoom se observó una superficie con un denso perfil granular (figura 7.1G) asociada a numerosas irregularidades con bordes y cortes observadas mediante SEM (figura 7.1H).

### 7.3.2. Adhesión y Proliferación Celular

Ensayos de adhesión y proliferación celular fueron realizados para evaluar las primeras interacciones de las células osteoblásticas con la superficie del biomaterial. Para el ensayo de adhesión, el número de células adheridas a los sustratos fue evaluado luego de 24 horas de cultivo. Los resultados se muestran en la figura 7.2 y están dados en término de la absorbancia medida a 630 nm. Se encontró diferencia estadística entre todos los resultados ( $p < 0.05$ , intervalo de confianza del 95 %). La adhesión de osteoblastos es favorecida por las superficies TCP y TCP+ácido, superando en más de 4 y 5 veces respectivamente el nivel de adhesión celular encontrado en la superficie maquinada. Esto sugiere un incremento en la interacción celular como consecuencia de la presencia de bordes y cortes en la superficie del biomaterial. Además, demuestra que la adhesión en superficies con poco tratamiento superficial es menor, corroborando la importancia de las estructuras a micro y sub-micro escala sobre el sustrato de prueba [19, 161].

La figura 7.3 muestra los resultados del ensayo de proliferación celular llevado a cabo tras 1, 2, 5, 6 y 7 días de cultivo. Los valores están dados en términos de la absorbancia a 570 nm, una medida proporcional a la actividad metabólica de las células viables e inversamente proporcional a la toxicidad del material [166]. Como se muestra, todas las superficies tienen una proliferación negativa luego de 1 y 2 días de cultivo, posiblemente a causa de la muerte celular durante la confluencia inicial de la siembra. Sin embargo, para la superficie maquinada, la superficie SBAE y la superficie TCP entre los días 2 y 5 de cultivo, los niveles de proliferación aumentan casi linealmente hasta alcanzar un máximo de proliferación en el día 6 de cultivo, después del cual los niveles disminuyen ligeramente hasta el día 7 de cultivo. Se encontró además que el máximo de proliferación es mayor en la superficie SBAE. En contraste a lo anterior, el perfil de proliferación de la superficie TCP+ácido muestra una lenta disminución entre los días 1 y 2 de cultivo luego de lo cual aumenta de forma exponencial hasta el

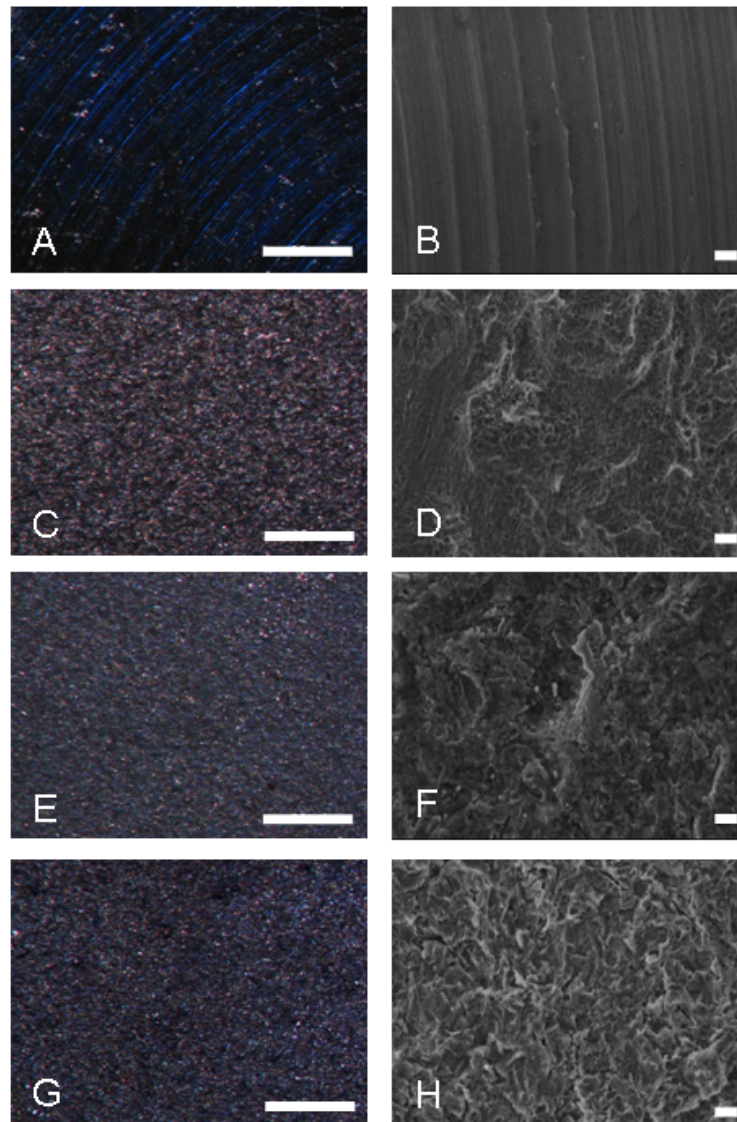


Figura 7.1: Imágenes de estereo zoom y SEM de los cuatro tipos de superficie empleadas en este estudio. Izquierda, microscopía de estereo zoom (4x, barra = 0.5 mm). Derecha, microscopía SEM (2.500x, barra = 10  $\mu\text{m}$ ). A) y (B) superficie maquinada, (C) y (D) superficie SBAE, (E) y (F) superficie TCP, (G) y (H) superficie TCP+ácido.

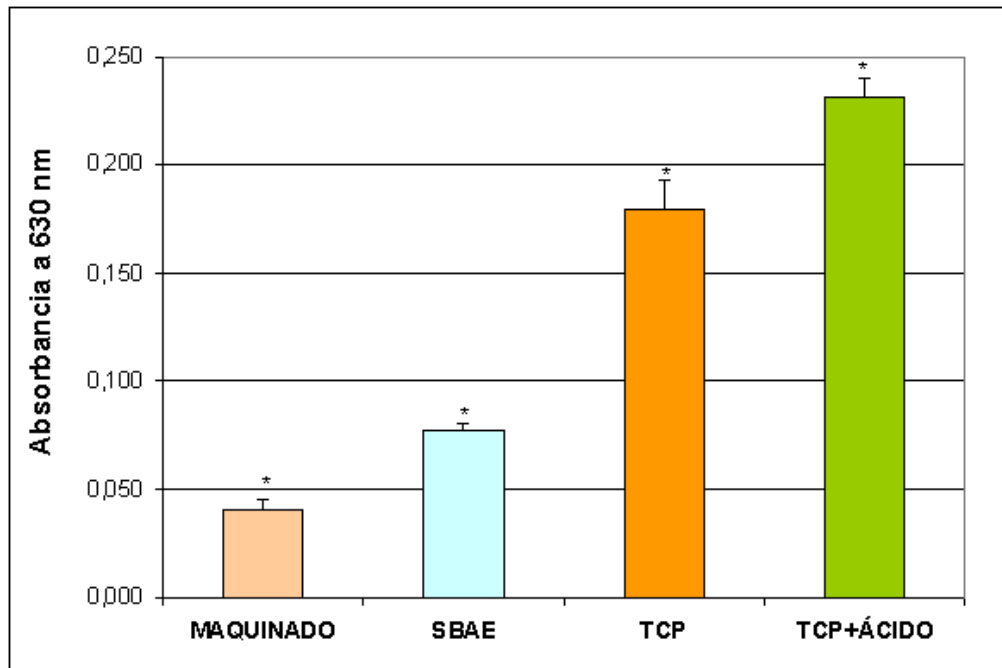


Figura 7.2: Resultados del ensayo de adhesión celular luego de 24 horas de cultivo. Barras = Error estándar. Un asterisco indica diferencia estadística entre los resultados con  $p < 0.05$ .

día 7 de cultivo. No se encontraron diferencias estadísticas significantes entre los resultados presentados.

### 7.3.3. Actividad de la Fosfatasa Alcalina

La actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) fue evaluada en las capas celulares de cada uno de los tipos de sustrato luego de 5 y 15 días de cultivo. Los resultados se resumen en la figura 7.4. No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las cuatro superficies ( $p < 0.001$ ) al cabo de los 15 días de cultivo, y no fue posible encontrar una relación estadística entre los resultados al cabo de los 5 días de cultivo. Para la superficie maquinada se observó un incremento en la actividad ALP de 1.8 veces entre los días 5 y 15 de cultivo. Para la superficie SBAE, este incremento fue de 4.3 veces. Para la superficie TCP el incremento encontrado es de 2.7 veces y para la superficie TCP+ácido el incremento es de 1.7 veces. Aunque el mayor incremento entre los días 5 y 15 de cultivo estuvo en la superficie SBAE, la actividad ALP en el día 15 de la superficie TCP es 2.1 veces mayor que en la superficie TCP+ácido, 3.9 veces

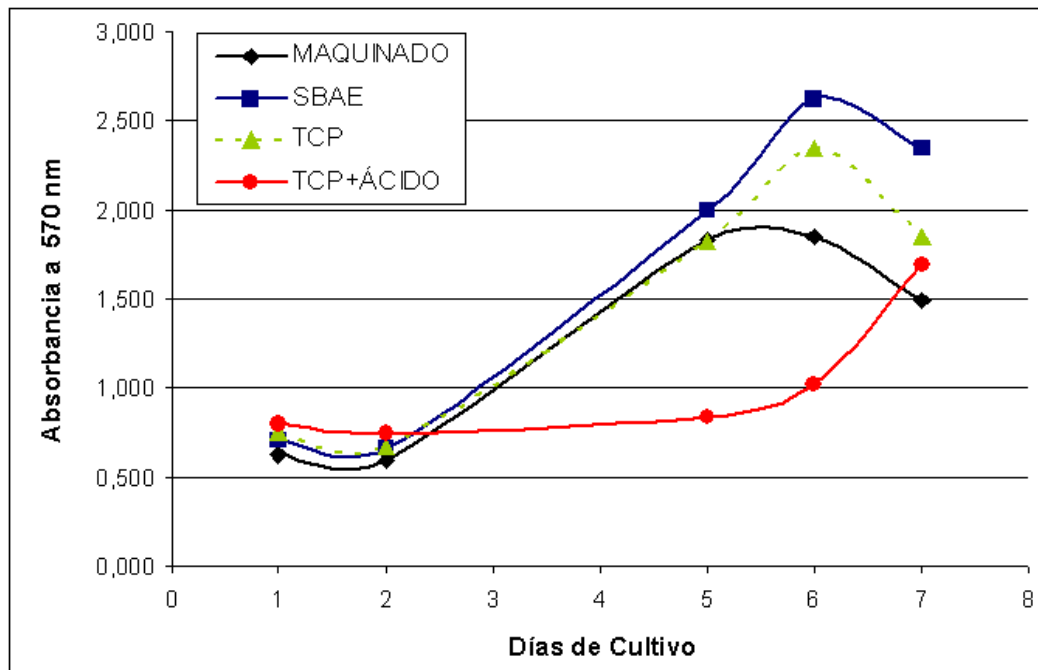


Figura 7.3: Resultados del ensayo de proliferación celular luego de 1, 2, 5, 6 y 7 días de cultivo.

mayor que en la superficie SBAE y 5.2 veces mayor que en la superficie maquinada. Estos resultados muestran que las superficies maquinada y SBAE presentan un perfil de actividad ALP considerablemente bajo comparado con el encontrado para la superficie TCP. Luego de 15 días de cultivo, la superficie TCP tiene la mayor actividad ALP doblando el valor de su contraparte más cercana, la superficie TCP+ácido, lo cual sugiere una gran afinidad de la superficie TCP con el proceso de biomineralización.

#### 7.3.4. Biomineralización

El ensayo de biomineralización se llevó a cabo luego de 5 días y 15 días de cultivo usando alizarina roja como marcador de los cristales de mineral. La figura 5 muestra la caracterización mediante microscopio de estereo zoom de la morfología de estos cristales. En términos cualitativos, en todas las superficies la presencia de cristales (aparición roja de las dos columnas de la figura 7.5) es mayor en el día 15 de cultivo comparada con el día 5 de cultivo [172]. Sin embargo, para las superficies maquinada (figura 7.5A y figura 7.5B) y SBAE (figura 7.5C y figura 7.5D), el proceso de mineralización durante el intervalo de tiempo de cultivo analizado



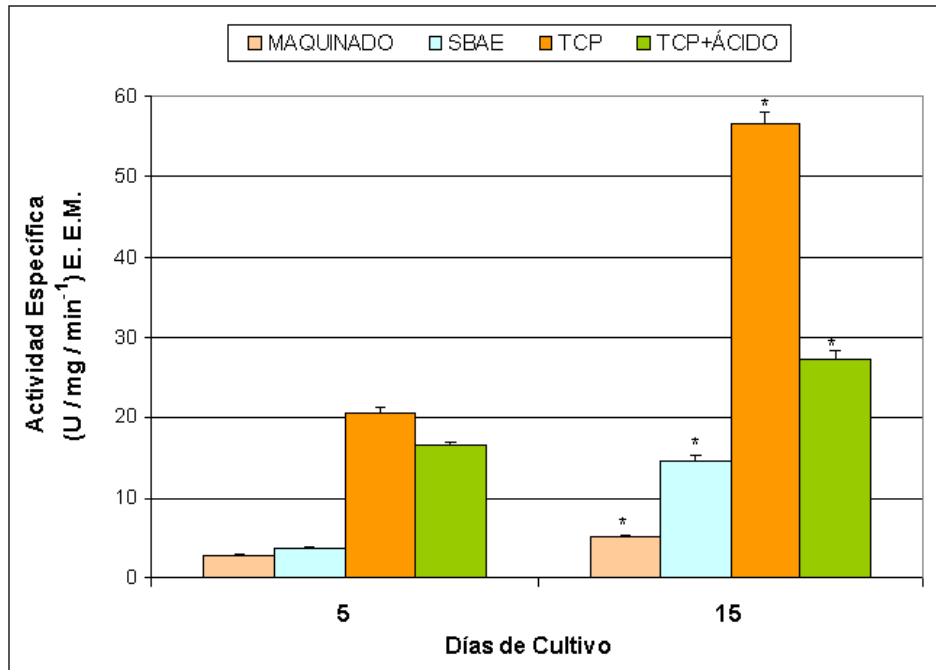


Figura 7.4: Resultados del ensayo de la actividad de la fosfatasa alcalina luego de 5 y 15 días de cultivo, Barras = Error estándar. Un asterisco indica diferencia significativa entre los resultados con  $p < 0.001$ .

no alcanza a cubrir completamente la superficie de los sustratos, de manera que parte de las líneas paralelas presentes en la superficie maquinada (figura 7.5B) y parte de la apariencia granular de la superficie SBAE (Fig. 5D) son aún visibles al cabo de 15 días de cultivo. Para las superficies TCP (figura 7.5E y figura 7.5F) y TCP+ácido (figura 7.5G y figura 7.5H) esto no sucede y de hecho la mineralización aparece distribuida de manera homogénea sobre los sustratos luego de 15 días de cultivo (figura 7.5F y figura 7.5H).

Como de acuerdo a los resultados de la figura 5 las superficies TCP y TCP+ácido poseen una mayor actividad de mineralización, las imágenes de estereo zoom tomadas a estos dos tipos de sustratos fueron analizadas utilizando el software ImageJ. Cada imagen fue escalada para ajustar las unidades. Se realizó segmentación de la imagen mediante umbrales de color usando como referencia un depósito de mineral (rojo oscuro) encontrado en la figura 7.5B. Las áreas mineralizadas fueron detectadas mediante la herramienta de medición de áreas. Los resultados obtenidos son mostrados en la figura 7.6 y corresponden al porcentaje de área total de la imagen cubierto por mineral.

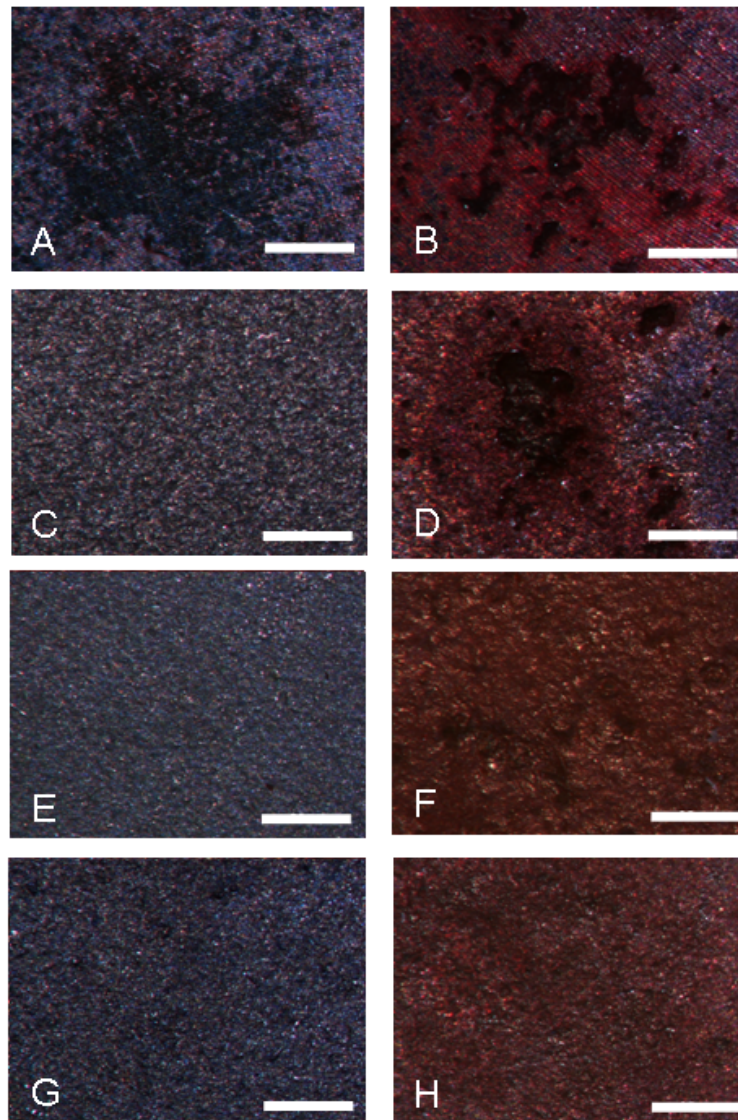


Figura 7.5: Imágenes de estereozoom del proceso de biomineralización. Izquierda, 5 días de cultivo. Derecha, 15 días de cultivo. Barra = 0.5 mm. (A) y (B) superficie maquinada, (C) y (D) superficie SBAE, (E) y (F) superficie TCP, (G) y (H) superficie TCP+ácido.

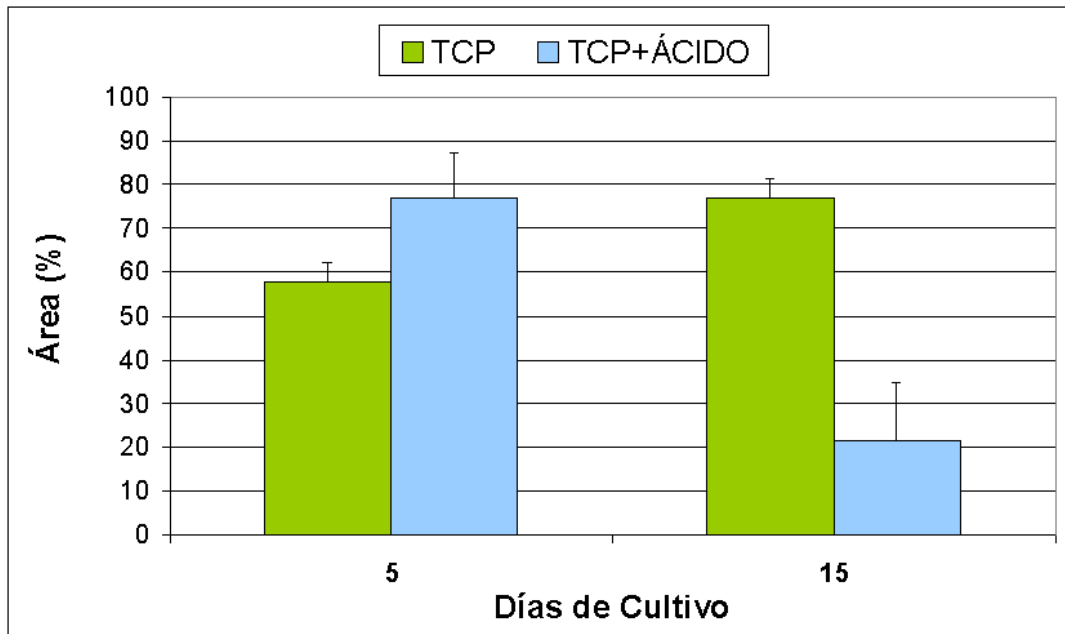


Figura 7.6: Porcentaje de área con actividad de biomineralización encontrada usando análisis de imágenes. Barras = Error estándar.

De acuerdo con la figura 7, luego de 5 y 15 días de cultivo el porcentaje de área total cubierto por mineral es mayor en la superficie TCP que en la superficie TCP+ácido. Esto es plausible ya que el ensayo de actividad de la fosfatasa alcalina muestra una mayor actividad en la superficie TCP. No se encontró diferencia estadística significativa en las áreas medidas para la superficie TCP+ácido luego de 5 días y 15 días de cultivo ( $p < 0.667$ ), por lo que se estima una baja tasa de formación de mineral en este tipo de sustrato. Este hecho concuerda con el bajo perfil de proliferación mostrado por la superficie TCP+ácido (figura 7.3) y la considerablemente baja variación en la actividad ALP entre los días 5 y 15 de cultivo en comparación con la superficie TCP.

## 7.4. Discusión

El objetivo de este trabajo es analizar cuatro tipos de superficies típicamente usados en implantes dentales y determinar mediante experimentos con cultivos celulares cuál de ellos presenta mejor comportamiento en términos de osteoinducción y osteoconducción. Por lo tanto, este estudio está basado en los resultados obtenidos de pruebas in-vitro de la activación

de células osteogénicas en función de la morfología superficial del implante. Se ha reportado que para que exista una adecuada oseointegración y osteogénesis los implantes dentales deben tener superficies con patrones de rugosidad similares a los dejados en la superficie del hueso durante el proceso de resorción y remodelado [19,26]. Por lo tanto, estos patrones deben tener dimensiones en la escala micrométrica con bordes y cortes en la escala sub-micrométrica [19]. La caracterización de las superficies analizadas mediante SEM muestra la existencia de microestructuras en cada una de los cuatro tipos de superficie (figura 7.1). En la superficie maquinada, estas microestructuras corresponden a estructuras onduladas paralelas separadas aproximadamente 5-10  $\mu\text{m}$ . Los resultados para las superficies SBAE, TCP y TCP+ácido muestra numerosas irregularidades del tipo “pico y valle”, aunque la densidad de estas irregularidades es menor en la superficie SBAE y mayor en la superficie TCP+ácido. Este cambio en la densidad del patrón de rugosidad corresponde a las variaciones en la cantidad de irregularidades superficiales creadas por los procesos de abrasión y corrosión.

Debido a que las irregularidades en escala sub-micrométrica influyen la creación de contactos focales y por lo tanto, la adhesión celular, la deformación del citoesqueleto de las células y su orientación [26], la superficie maquinada presenta el rendimiento más bajo en términos de adhesión celular (figura 7.2). Además, como la presencia de recubrimientos basados en HA/TCP en las superficies TCP y TCP+ácido incrementa la osteoinducción [26], los perfiles de adhesión en estos dos tipos de superficie son mayores. A partir de los resultados presentados se ha encontrado que la presencia de una morfología superficial en la escala sub-micrométrica y el uso de recubrimientos basados en HA/TCP aumenta la adhesión celular 5.8 veces con respecto a una superficie sin patrones de rugosidad y sin recubrimiento. Estos resultados confirman que una adecuada superficie de implante dental no sólo debe poseer una morfología superficial caracterizada por la presencia de patrones de rugosidad sino también un recubrimiento osteoconductor que proporcione la respuesta bioactiva, es decir, que promueva la formación de compuestos basados en HA en la superficie del biomaterial al entrar en contacto con el tejido óseo in-vivo [19,26].

Por otra parte, para determinar la biocompatibilidad de las muestras, se evaluó la proliferación celular luego de 1, 2, 5, 6 y 7 días de cultivo. Debido a que el titanio y sus aleaciones poseen una comprobada biocompatibilidad [53], y específicamente la aleación Ti-6Al-4V posee una adecuada capacidad osteogénica [172], la superficie maquinada ha sido considerada

como el control del ensayo de proliferación. De los resultados mostrados en la figura 7.3 se observa que las cuatro superficies tienen un perfil de proliferación creciente y en los casos de las superficies SBAE, TCP y TCP+ácido los valores siempre se encuentran por encima de los valores del perfil de control, según lo cual, en principio, ninguna de las superficies es tóxica para las células osteoblásticas [166]. Se ha encontrado que luego de 5 días de cultivo, la proliferación celular en las superficies maquinada, SBAE y TCP decrece hasta un aparente nivel de saturación en el día 7, que puede estar relacionado con muerte celular debido a una elevada confluencia celular en el área de los sustratos. A pesar que la superficie TCP+ácido parece alcanzar el mismo nivel de saturación mencionado en el día 7 de cultivo, su comportamiento de carácter exponencial indica que el mecanismo particular de proliferación celular en este tipo de superficie difiere del presentado por las demás. Además, aunque es sobre la superficie TCP+ácido que se encuentra el mejor perfil de adhesión, es sólo hasta después del día 5 de cultivo que las células comienzan a proliferar.

Este retraso en la proliferación ha sido observado por otros autores [173, 174] como una consecuencia de la elevada rugosidad superficial creada por la acción combinada de las técnicas de abrasión y corrosión [159] durante la fabricación de la superficie TCP+ácido. Aunque el mecanismo de señalización del retraso en la proliferación es aún desconocido, puede que sea causado por el aumento en las fuerzas de contacto que inducen el reordenamiento de las células y retrasan o incluso restringen el ciclo celular [60, 173]. No obstante, esta reducción en el perfil de proliferación para la superficie TCP+ácido no es suficiente argumento para considerarla como no biocompatible ya que luego de 7 días de cultivo las células alcanzan un nivel de confluencia, lo cual sólo es posible si las células permanecen viables durante todo el tiempo de cultivo [167].

Luego de la proliferación, las células osteoblásticas comienzan la deposición y mineralización de la nueva matriz ósea [25]. La biomineralización es esencial para el rendimiento óptimo del implante dental, creando una conexión viable entre el hueso vivo y la superficie del implante que precede la oseointegración [4, 23, 25]. La habilidad de las células osteoblásticas para producir nódulos de mineralización fue evaluada por medio del ensayo de actividad ALP y la caracterización de los depósitos de mineral. A partir de los resultados mostrados en la figura 7.4 se observó que luego de 15 días de cultivo el mayor nivel de actividad ALP está presente en la superficie TCP, seguida de la superficie TCP+ácido. Estos resultados, junto con los

resultados del ensayo de adhesión celular, nos permiten concluir que las superficies TCP y TCP+ácido son las mejores opciones de superficie para un implante dental comparadas con las superficies maquinada y SBAE.

Además, los resultados del ensayo de actividad ALP confirman el buen comportamiento de la superficie TCP encontrado mediante el ensayo de proliferación y en comparación con la superficie TCP+ácido. Aunque los resultados del ensayo de adhesión celular para la superficie TCP+ácido son mayores comparados con la superficie TCP debido a la mayor rugosidad superficial del primero, esta misma característica de la superficie TCP+ácido no sólo disminuye su perfil de proliferación como ha quedado descrito sino que también afecta la actividad ALP debido a que existe una menor tasa de diferenciación de osteoblastos [173]. Así mismo, el ensayo de biomineralización confirma que las superficies maquinada y SBAE poseen una baja deposición de mineral luego de 15 días de cultivo como se muestra en la figura 7.5. El análisis cuantitativo realizado mediante procesamiento e imágenes resumido en la figura 7.6 confirma que la superficie TCP posee mejor rendimiento ya que el porcentaje de área total cubierta por depósitos de mineral es 2.74 veces mayor que el encontrado en la superficie TCP+ácido, nuevamente, en concordancia con los resultados obtenidos por el ensayo de actividad ALP.

## 7.5. Conclusiones

En el presente trabajo se analiza la respuesta biológica de células humanas con carácter osteoblástico sobre cuatro superficies de implantes dentales comunes para determinar aquella con mejor comportamiento en términos de adhesión celular, proliferación celular y biomineralización. Los resultados del ensayo de adhesión celular muestran que las células osteoblásticas se adhieren a las superficies TCP y TCP+ácido de mejor forma que sobre las superficies maquinadas y SBAE. De acuerdo a esto se concluye que las superficies TCP y TCP+ácido demuestran tener una mejor osteoinducción. El ensayo de proliferación celular muestra que luego de 7 días de cultivo la superficie TCP+ácido posee la menor tasa de proliferación, debido a su mayor rugosidad superficial [159,173]. El proceso de biomineralización fue evaluado luego de 5 y 15 días de cultivo con el fin de determinar la formación de nódulos de mineral sobre las superficies. La actividad de la fosfatasa alcalina (ALP), presente durante el proceso de mineralización [66,92], fue igualmente evaluada. El adecuado perfil de adhesión de la

superficie TCP y la considerable alta tasa de proliferación tras 7 días de cultivo fueron confirmados por los resultados del ensayo de actividad ALP de los cuales la superficie TCP tiene el mejor comportamiento e incluso dobla en magnitud el resultado obtenido por la superficie TCP+ácido. La cuantificación de los depósitos minerales corrobora el ensayo de actividad ALP ya que el porcentaje de área total de las muestras cubierto por mineral es 2.1 veces más alto en la superficie TCP que en la superficie TCP+ácido. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la superficie TCP promueve la formación de depósitos minerales, es decir, la osteoconducción, a una tasa mayor que las superficies maquinada, SBAE y TCP+ácido. Aunque la formación de matriz ósea mineralizada es el proceso más importante de cara a obtener una adecuada oseointegración [4, 34], ninguna de las superficies analizadas es tóxica para las células osteoblásticas y todas permiten la adhesión, proliferación y biomineralización. No obstante, es necesario realizar análisis adicionales para establecer el comportamiento de las superficies a largo plazo, ya que la respuesta temprana de las células osteoblásticas aquí presentada no necesariamente predice el grado de oseointegración de un determinado sustrato.

## CAPÍTULO 8

### DISCUSIÓN FINAL Y TRABAJO FUTURO

El objetivo de esta tesis es formular, implementar y validar un modelo matemático con enfoque mecanobiológico de la oseointegración de un implante dental. Aunque este objetivo se ha cumplido, durante su desarrollo se han encontrado algunas limitantes que merecen ser discutidas y expuestas como líneas de trabajo futuro.

La primera limitante está relacionada con el alcance de la descripción mecanobiológica de la interfase hueso-implante dental y del proceso de oseointegración. Actualmente se disponen de herramientas de acceso a información que permiten hacer una revisión detallada del proceso de cicatrización y oseointegración en la interfase hueso-implante dental. Debido a esto es inevitable que durante la revisión se encuentren aspectos descriptivos que aumentan la complejidad del problema inicialmente planteado y que desvían la línea de trabajo del objetivo principal [137, 154]. Por esta razón, la labor investigativa debe ser concentrada en los detalles generales sin ahondar en todas las particularidades. Esto hace que la descripción final sea limitada y a la vez subjetiva de acuerdo al criterio de selección usado para determinar los aspectos particulares más relevantes.

Estos aspectos particulares encontrados en la revisión imponen además la necesidad de simplificar la descripción matemática del problema. Debido a la complejidad de los sistemas biológicos y mecanobiológicos, considerar todas las particularidades de la descripción en la formulación matemática conduce a modelos con un elevado número de variables y parámetros desconocidos [65, 114]. Aunque esto supone una mayor exactitud del modelo respecto al



problema real, también implica una mayor complejidad de la implementación numérica y una mayor demanda de recursos computacionales, tiempo de procesamiento y tiempo de análisis de resultados [29, 118, 120]. Por lo tanto, es necesario simplificar la formulación matemática para analizar los aspectos generales y, en la medida de lo posible, los aspectos particulares más relevantes [33, 160]. A partir de esta limitante se concluye que una de las líneas de trabajo futuro es profundizar en detalles de la descripción del problema así como en la inclusión de particularidades en el modelo matemático acá presentado de tal manera que se aumente su complejidad y exactitud. Un modelo matemático detallado de la oseointegración de implantes dentales puede ser utilizado en la práctica odontológica como herramienta diagnóstica para evaluar la viabilidad de un implante en función de aspectos particulares como las condiciones anatómicas y fisiológicas del paciente y el hueso receptor [15, 41], los factores mecánicos de adhesión y activación [18, 25], y el procedimiento de inserción del implante [55, 56].

Precisamente, una segunda limitante también relacionada con la simplificación del modelo tiene que ver con la ausencia de los denominados factores mecánicos de adhesión y factores mecánicos de activación en la implementación final del modelo. Si bien los factores mecánicos de contracción fueron incluidos para obtener resultados numéricos que concuerdan con resultados experimentales, la inclusión de los demás factores mecánicos se cree puede constituir una amplia línea de trabajo futuro relacionada con el análisis de la interacción entre 1) la superficie del implante dental y la adhesión celular [21, 26, 60, 146], 2) el balance de las fuerzas de contracción con las fuerzas de adhesión evitando la pérdida de tejido en la superficie del implante [15, 24, 101], 3) la distribución de fuerzas externas y su relación con el diseño del implante [31, 47] 4) el remodelamiento óseo a causa de las fuerzas externas [5, 13, 106] y 5) el mecanismo celular de mecanotransducción [18, 25, 104]. Se cree que las contribuciones de estos fenómenos al modelo pueden representar el modelamiento de dispositivos usados en ortodoncia (mini-implantes) donde la respuesta mecánica del hueso predomina sobre la respuesta biológica.

La tercera limitante está relacionada con el tiempo necesario para lograr la adecuada oseointegración de un implante dental. Se ha establecido que la oseointegración inicial se alcanza entre 3 y 6 meses después de insertar el implante [4, 13] y que debido al proceso de remodelado óseo las propiedades biomecánicas del nuevo hueso se encuentran en constante consolidación incluso varios años después de la inserción [1, 2]. Por lo tanto, el modelo ma-

temático acá presentado y que analiza los primeros 21 días después de la inserción del implante debe ser ampliado temporalmente para incluir el proceso de remodelado óseo ya que no es posible garantizar una adecuada oseointegración a partir del análisis de los estadios tempranos de recuperación tisular [165,166]. Esta misma restricción temporal fue observada en la respuesta de los experimentos con cultivos celulares (Capítulo 7) a partir de los cuales se concluye que es necesario ampliar el tiempo de experimentación para establecer el comportamiento a largo plazo de las superficies de cultivo.

La cuarta limitante tiene que ver con los parámetros numéricos del modelo. Aunque algunos parámetros se encuentran en la literatura, la falta de experimentos dedicados a la cuantificación de eventos celulares y moleculares es una debilidad que este modelo comparte con otros modelos matemáticos con enfoque biológico [33]. Aunque tradicionalmente se recurre al análisis y ajuste numérico para suplir la ausencia de parámetros experimentales, es necesario iniciar líneas de trabajo experimental para complementar la información numérica necesaria para el modelo y que además sirvan como mecanismos de validación de los resultados numéricos. Un primer acercamiento al complemento experimental realizado en este proyecto (Capítulo 7) permitió obtener parámetros numéricos correlacionados con la adhesión y proliferación celular. Sin embargo, es necesario ampliar el alcance de estos experimentos para identificar parámetros de mitosis y apoptosis celular, síntesis y degradación de moléculas, y producción y consumo de sustancias disueltas en el ambiente extracelular. Además, se considera necesario evaluar experimentalmente el comportamiento mecánico de las células para validar los fenómenos de adhesión, contracción y activación respecto a diferentes tipos de superficies de implante dental.

A pesar de estas limitaciones, se concluye que a partir de una revisión detallada de las generalidades del hueso alveolar [23, 38], del implante dental y su superficie [10, 26, 59], y de los mecanismos tanto biológicos como mecánicos involucrados en la recuperación tisular de la interfase hueso-implante dental [15, 17, 18, 25, 66], es posible obtener una descripción general del proceso de oseointegración de un implante dental. Mediante el método de los elementos finitos se han implementado modelos con enfoque biológico que tradicionalmente han sido empleados para describir matemáticamente procesos de morfogénesis, actividad celular y crecimiento tisular [118,125,126]. A partir de estas implementaciones computacionales y la simplificación de la descripción del proceso de oseointegración, ha sido posible formular un

modelo mecanobiológico de la cicatrización de la interfase hueso-implante dental que conduce a la formación de hueso y posterior oseointegración del implante.

Este modelo se caracteriza por la introducción de una formulación matemática original del proceso de coagulación de la sangre que condiciona la recuperación tisular en la interfase hueso-implante dental. Con esta inclusión, el modelo presentado supera el alcance de trabajos previamente publicados [33, 109, 137, 154] ya que permite analizar no sólo el proceso de coagulación en la interfase sino también características del paciente como son los desórdenes hematológicos conocidos como trombocitosis y trombocitopenia. Adicionalmente, con la implementación matemática del fenómeno de contracción celular presente durante la cicatrización de la interfase hueso-implante dental [24], este nuevo modelo permite predecir la oseointegración de un implante dental en función no sólo de su superficie, como ya ha sido reportado por otros autores [33], sino también en función de los desplazamientos de las fibras que componen el coágulo de sangre. *Por lo tanto, al considerar la etapa de coagulación de la sangre y el fenómeno mecánico de contracción en conjunto con las demás características biológicas relevantes, el modelo finalmente obtenido se convierte en la primera descripción mecanobiológica conocida de la interfase hueso-implante dental.*

Por otro lado, en búsqueda de ampliar el alcance del modelo planteado, se propone una línea de trabajo futuro basada en la capacidad de los campos electromagnéticos para estimular la recuperación tisular y la formación de hueso en la interfase hueso-implante dental.

Trabajos experimentales han permitido saber que las células en un campo eléctrico DC aplicado externamente siempre intentan orientarse en la dirección perpendicular a las líneas del campo aplicado. Por lo tanto, los campos eléctricos DC son capaces de modificar la geometría de las células prolongando y estirando los citoplasmas [175]. Varios de los eventos relacionados con la migración celular, como la contracción de los filamentos citoplasmáticos de actina, la formación de contactos focales, proteólisis de proteínas específicas sobre los sustratos, contracción del citoesqueleto celular, y disociación y desprendimiento de contactos focales en los bordes de arrastre de las células han sido observados durante el movimiento celular inducido por campos electromagnéticos [176].

Se ha reportado que las células que se adhieren a un implante con irregularidades superficiales del orden de los micrómetros tienden a migrar y alinearse en la dirección de las

estructuras superficiales. Este proceso se conoce como *orientación por contacto* [177]. Por lo tanto, una diferencia de altura en el patrón de rugosidad de una superficie es suficiente para inducir orientación por contacto en las células. En experimentos con superficies de titanio se encontró que existen diferencias en el potencial electrostático de carga superficial del orden de los milivoltios en las interfases entre el material y su recubrimiento [178]. Se cree que la presencia de estos gradientes en el potencial de carga superficial pueden ser responsables por la orientación de las células [179]. En experimentos adicionales se ha encontrado que la aplicación fisiológica de campos eléctricos DC condiciona el movimiento de células óseas y otros tipos de células. Este fenómeno se conoce como *electrotaxis* o *galvanotaxis* [180,181]. Pruebas *in vitro* han determinado que varios tipos de células (células neuronales, fibroblastos, queratinocitos, condrocitos, células epiteliales y osteoblastos) migran hacia el cátodo cuando la intensidad de los campos eléctricos aplicados es del orden de 0.1-10 V/cm, mientras son pocos los tipos celulares que migran en dirección del ánodo (células de cornea, granulocitos y células endoteliales) [176,182]. En estos casos, tanto la velocidad como la dirección de movimiento dependen del voltaje aplicado [176].

Se ha determinado que la aplicación de campos eléctricos actúa sobre la adhesión celular mediante la modificación del anclaje del citoplasma al sustrato creado por la acción de las integrinas [176,183]. Modificaciones a la conductividad del sustrato mediante el uso de recubrimientos poliméricos favorece la absorción de proteínas y la consecuente adhesión celular debido a que las biomoléculas de interés son atraídas eléctricamente a la superficie. Sustratos electroactivos han sido estudiados con el propósito de controlar la inmovilización de péptidos de adhesión celular como el péptido RGD involucrado en la actividad de las integrinas [183]. Se ha demostrado que la estimulación eléctrica acelera la cicatrización de fracturas. Por ejemplo, en modelos animales se ha encontrado que la formación de hueso aumenta cuando se aplican corrientes eléctricas de diferentes amplitudes. Campos electromagnéticos pulsantes también se han utilizado para tratar fracturas y problemas de cicatrización con tasas de éxito del 64-85 % [184]. Se ha encontrado que estos campos causan efectos que favorecen la cicatrización de los tejidos blandos y los huesos activando o retrasando la actividad de osteoblastos, osteoclastos, queratinocitos, fibroblastos, miocitos, células endoteliales y células nerviosas [181]. Estudios experimentales han concluido que la aplicación de campos electromagnéticos aumentan la tasa de cicatrización y por lo tanto inducen una mayor oseointegración en los implantes

dentales [185,186]. Así mismo, se ha encontrado que la aplicación de campos electromagnéticos pueden prevenir la pérdida de hueso que normalmente ocurre durante la inmovilización, los descansos prolongados en cama o los vuelos espaciales, debido a que reemplazan la actividad metabólica inducida por la presencia de cargas externas como el propio peso y la gravedad [25,181].

Por lo tanto, se considera que es posible establecer una relación entre la aplicación de campos electromagnéticos, la migración celular, la contracción causada por la migración celular y la superficie del sustrato. Se cree que una mayor adhesión celular en el sustrato, debida a la activación electro-química de la interfase puede causar una mayor recuperación tisular con el consecuente aumento en la formación de hueso y oseointegración del implante. De acuerdo a una revisión preliminar de la literatura disponible no existe un modelo matemático de recuperación tisular que incluya la influencia de los campos electromagnéticos. Por esta razón, con la formulación de un modelo de la estimulación electromagnética en la interfase hueso-implante dental se espera generar un avance significativo en el campo del modelado de procesos biológicos integrando conceptos de la mecanobiología con el campo del bioelectromagnetismo. El modelo matemático resultante podrá ser utilizado como herramienta metodológica para la formulación de posteriores modelos de recuperación tisular electroestimulada así como para el diseño de protocolos de experimentación in-vitro que permitan a largo plazo plantear modificaciones en el diseño de un implante dental comercial basadas en la electroestimulación celular y tisular.

## APENDICE A

# SOLUCIÓN DE LAS ECUACIONES DE REACCIÓN-DIFUSIÓN MEDIANTE EL MÉTODO DE LOS ELEMENTOS FINITOS

Gracias a su flexibilidad de programación y facilidad de análisis de geometrías complejas, los elementos finitos se constituyen en una herramienta poderosa para la solución de ecuaciones diferenciales en derivadas parciales.

En el caso de las ecuaciones de reacción difusión, el problema consiste en hallar  $(u, v)$  para todo instante de tiempo. Para ello, se multiplica cada una de las ecuaciones por una función arbitraria  $\delta u$  y  $\delta v$ , respectivamente. Además se integra sobre el dominio de análisis con lo que se obtiene:

$$\int_{\Omega} \frac{\partial u}{\partial t} \delta u dx = \int_I f(u, v) \delta u dx + \int_{\Omega} D_1 \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} \delta u d\Omega \quad (\text{A.1a})$$

$$\int_{\Omega} \frac{\partial v}{\partial t} \delta v dx = \int_I g(u, v) \delta v dx + \int_{\Omega} D_2 \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} \delta v d\Omega \quad (\text{A.1b})$$

donde  $\Omega$  es el dominio de integración, que para este caso es unidimensional. Llevando a cabo integración por partes y ordenando la ecuación se tiene:

$$\int_{\Omega} \frac{\partial u}{\partial t} \delta u dx - \int_I f(u, v) \delta u dx + \int_{\Omega} D_1 \frac{\partial u}{\partial x} \frac{\partial \delta u}{\partial x} d\Omega = 0 \quad (\text{A.2a})$$

$$\int_{\Omega} \frac{\partial v}{\partial t} \delta v dx - \int_I g(u, v) \delta v dx + \int_{\Omega} D_2 \frac{\partial v}{\partial x} \frac{\partial \delta v}{\partial x} d\Omega = 0 \quad (\text{A.2b})$$

donde se ha considerado que el flujo es nulo en el contorno. Las ecuaciones integrales (A.2) son la *forma débil* de las ecuaciones diferenciales parciales de reacción-difusión de Schnakenberg presentadas en el capítulo 4.

Si se elige interpolación lineal continua para las variables  $u$  y  $v$ , con el uso de elementos de dos nodos (A.1a) la interpolación se puede escribir como [133]:

$$N^1(x) = \frac{x - x_2}{x_1 - x_2} = \frac{x_2 - x}{l(e)} \quad (\text{A.3a})$$

$$N^2(x) = \frac{x - x_1}{x_2 - x_1} = \frac{x - x_1}{l(e)} \quad (\text{A.3b})$$

donde  $N_1$  y  $N_2$  son las *funciones de forma*, y  $x_1$  y  $x_2$  son las coordenadas de los nodos del elemento ( $e$ ), definido como se muestra en la figura A.1b. Utilizando la *Formulación Isoparámetrica* [131, 133], la interpolación de las variables y de la geometría queda definida como sigue:

$$\text{Geometría} = \left\{ \begin{array}{l} x = \sum_{l=1}^2 N^l x^l = \mathbf{N} \cdot \mathbf{x} \end{array} \right. \quad (\text{A.4})$$

$$\text{Variables} = \left\{ \begin{array}{l} u = \sum_{l=1}^2 N^l u^l = \mathbf{N} \cdot \mathbf{u} \\ v = \sum_{l=1}^2 N^l v^l = \mathbf{N} \cdot \mathbf{v} \end{array} \right. \quad (\text{A.5})$$

Sustituyendo las aproximaciones (A.4) en las ecuaciones (A.2) y utilizando el *Método de Galerkin* [133], tal que  $\delta u = \delta v = N^l$  se obtiene el siguiente sistema discreto a nivel elemental:

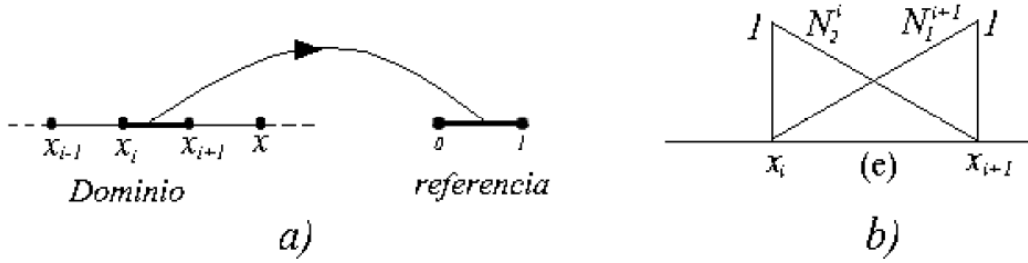


Figura A.1: Uso del elemento de referencia para la integración. a) Aplicación entre elementos, b) Un elemento.

$$\mathcal{F} = \mathbf{M}^{(e)} \frac{d\mathbf{u}}{dt} - \gamma(a\mathbf{R}^{(e)} - \mathbf{M}^{(e)}\mathbf{u} + v(u^2)\mathbf{R}^{(e)}) + \mathbf{K}^{(e)}\mathbf{u} = 0 \quad (\text{A.6a})$$

$$\mathcal{G} = \mathbf{M}^{(e)} \frac{d\mathbf{v}}{dt} - \gamma(b\mathbf{R}^{(e)} - v(u^2)\mathbf{R}^{(e)}) + \mathbf{K}^{(e)}\mathbf{v} = 0 \quad (\text{A.6b})$$

donde cada una de las matrices y vectores de las ecuaciones (A.6) se muestran en detalle a continuación:

$$\mathbf{M}^{(e)} = M^{ij} = \int_{\Omega} N^i N^j d\Omega \quad (\text{A.7a})$$

$$\mathbf{K}^{(e)} = K^{ij} = \int_{\Omega} \frac{\partial N^i}{\partial x} \frac{\partial N^j}{\partial x} d\Omega \quad (\text{A.7b})$$

$$\mathbf{R}^{(e)} = R^i = \int_{\Omega} N^i d\Omega \quad (\text{A.7c})$$

Por su parte, la discretización temporal se realiza mediante el método de diferencias en atraso *Backward Euler*. Según este método la derivada temporal puede escribirse en forma discreta como [187]:

$$\frac{\partial u}{\partial t} \cong \frac{\Delta u}{\Delta t} \cong \frac{u^i - u^{i-1}}{\Delta t} \quad (\text{A.8})$$



donde  $u^i$  es el valor de  $u$  en la iteración actual,  $u^{i-1}$  es el valor de  $u$  en la iteración anterior y  $\Delta t$  es el intervalo o paso de tiempo.

Este mismo proceso se repite para cada uno de los elementos que componen el dominio del problema construyendo a partir de las expresiones elementales una expresión global o *ensamble* [133]. Esta expresión global depende de la distribución de las funciones de forma en cada elemento, dada como se muestra en la figura A.2 [131, 133].

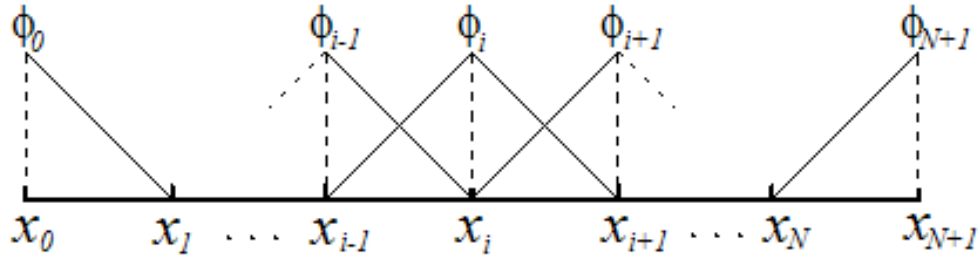


Figura A.2: Funciones de forma globales

Las ecuaciones A.6 se implementan en una rutina de usuario *UEL* programada Fortran Intel 11 (Intel Corp., USA) que se soluciona utilizando el software *ABAQUS* 6.6 (Simulia Dassault Systèmes, USA). En este software se requiere evaluar el siguiente sistema de ecuaciones:

$$(\mathbf{AMATRX})_F \Delta \mathbf{u} = \mathbf{RHS}_F \quad (\text{A.9a})$$

$$(\mathbf{AMATRX})_G \Delta \mathbf{v} = \mathbf{RHS}_G \quad (\text{A.9b})$$

donde  $\mathbf{AMATRX}$  es la *matriz tangente elemental* y *RHS* (Right Hand Side) es el *vector residuo elemental* [188],  $\Delta \mathbf{u} = (\Delta u^1, \Delta u^2)^T$  y  $\Delta \mathbf{v} = (\Delta v^1, \Delta v^2)^T$ . Como  $\mathbf{RHS} = -\mathcal{F}$  [188], entonces  $\mathbf{RHS}_F = -(F^1, F^2)^T$  y  $\mathbf{RHS}_G = -(G^1, G^2)^T$ .

A continuación se describe el método para hallar la matriz tangente  $\mathbf{AMATRX}_F$ . Para determinar los términos correspondientes a la implementación de la solución de  $\mathcal{G}$  se procede de forma similar.

La matriz  $\mathbf{AMATRIX}_F$  se desarrolla en serie de Taylor ( $\mathcal{F}_{k+1}|^{n+1}$ ) alrededor de la solución obtenida en la iteración anterior  $k$ :

$$\mathcal{F}_{k+1}|_i^{n+1} = \mathcal{F}_k|^{n+1} + \frac{\partial \mathcal{F}_k|^{n+1}}{\partial \mathbf{u}} \Delta \mathbf{u} = 0 \quad (\text{A.10})$$

con lo cual se obtiene:

$$\mathbf{AMATRIX} = \mathbf{M}^{(e)} \frac{1}{\Delta t} - \gamma((-1 + 2uv)\mathbf{M}^{(e)}) + \mathbf{K}^{(e)} \quad (\text{A.11a})$$

De la misma forma se obtiene el sistema de ecuaciones que se soluciona para la variable  $v$ . La solución del sistema de ecuaciones dado por [A.9](#) se realiza utilizando el *Método de Newton-Raphson* para encontrar las raíces [187]. Es importante notar que en cada paso de iteración se actualizan los sistemas, hasta encontrar la convergencia. Cuando se alcanza la convergencia se avanza un paso de tiempo y se resuelve recursivamente hasta el paso de tiempo final.

### Análisis en dos dimensiones

La extensión de la formulación de elementos finitos para la solución de las ecuaciones de Schnakeneberg de 1D a 2D se lleva a cabo reemplazando las funciones de forma y considerando la nueva geometría. Las funciones de forma en 2D dependen del tipo de elemento elegido para el análisis (según su geometría: triángulo o cuadrilátero; según el tipo de polinomio de aproximación: lagrangiano o serendípito; y según el orden de aproximación: lineal, cuadrática, cúbica etc [133]). En la implementación que nos concierne se utilizan elementos cuadriláteros bilineales. La definición de estos elementos y su relación con el cuadrilátero de referencia se observa en la figura [A.3](#). Por lo tanto las funciones de forma se determinan por [133]:

$$N_1(\xi, \eta) = \frac{1}{4}(1 - \xi)(1 - \eta) \quad (\text{A.12a})$$

$$N_2(\xi, \eta) = \frac{1}{4}(1 + \xi)(1 - \eta) \quad (\text{A.12b})$$

$$N_3(\xi, \eta) = \frac{1}{4}(1 + \xi)(1 + \eta) \quad (\text{A.12c})$$

$$N_4(\xi, \eta) = \frac{1}{4}(1 - \xi)(1 + \eta) \quad (\text{A.12d})$$

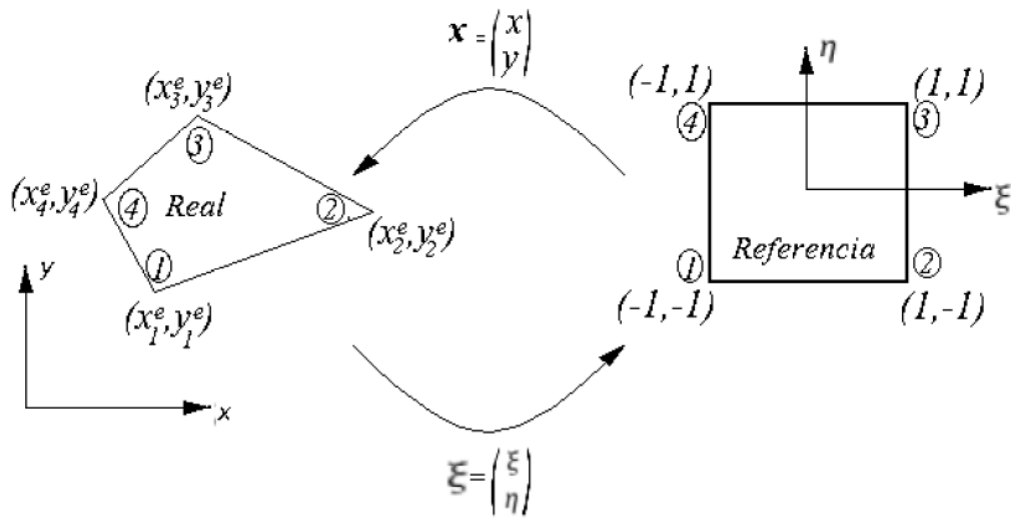


Figura A.3: Relación entre el cuadrilátero de referencia y de la geometría real. El número de cada nodo se ha colocado entre un círculo.

La aproximación de la geometría y de las variables viene dada por:

$$\text{Geometría} = \begin{cases} x(\xi, \eta) = \sum_{i=1}^4 N_i(\xi, \eta) x_i^{(e)} \\ y(\xi, \eta) = \sum_{i=1}^4 N_i(\xi, \eta) y_i^{(e)} \end{cases} \quad (\text{A.13})$$

$$\text{Variables} = \begin{cases} u(\xi, \eta) = \sum_{i=1}^4 N_i(\xi, \eta) U_i^{(e)} \\ v(\xi, \eta) = \sum_{i=1}^4 N_i(\xi, \eta) V_i^{(e)} \end{cases} \quad (\text{A.14})$$

La aproximación de las variables  $U$  y  $V$  en dos dimensiones se reemplaza en cada uno de los términos de las ecuaciones que conforman la forma débil del sistema de reacción-difusión

en dos dimensiones. En este sistema se obtienen integrales dobles que se pueden discretizar mediante una expansión de la metodología usada en la solución de las ecuaciones de reacción-difusión en 1D.

En una dimensión las integrales obtenidas de la forma débil pueden ser resueltas de forma analítica. Sin embargo, en dos dimensiones las integrales son dobles y requieren la continua aplicación entre el elemento de referencia y el elemento real. Un ejemplo de su utilización se presenta en la siguiente relación, donde la integral es transformada del espacio real al espacio del elemento de referencia:

$$\underbrace{\int_{\Omega^{(e)}} f(x, y) d\Omega}_{\text{Espacio Real}} = \underbrace{\int_{-1}^1 \int_{-1}^1 f(x(\xi, \eta), y(\xi, \eta)) |\mathbf{J}(\xi, \eta)| d\xi d\eta}_{\text{Espacio del Elemento de Referencia}} \quad (\text{A.15})$$

donde  $\Omega^{(e)}$  es el dominio elemental y  $|J|$  es el determinante del jacobiano que relaciona el elemento de referencia con el de la geometría real dado por:

$$\mathbf{J}(\xi, \eta) = \begin{pmatrix} \frac{\partial \xi}{\partial x} & \frac{\partial \xi}{\partial y} \\ \frac{\partial \eta}{\partial x} & \frac{\partial \eta}{\partial y} \end{pmatrix} \quad (\text{A.16})$$

Las integrales se resuelven mediante el *Método de la Cuadratura de Gauss* [133]). De acuerdo con este método, la integral definida en el espacio del elemento de referencia se reemplaza por una sumatoria aproximada dada por:

$$\int_{-1}^1 \int_{-1}^1 f(x(\xi, \eta), y(\xi, \eta)) |\mathbf{J}(\xi, \eta)| d\xi d\eta = \sum_{i=1}^{NPG_x} \sum_{j=1}^{NPG_y} f(\xi_i, \eta_j) |\mathbf{J}(\xi_i, \eta_j)| W_i W_j \quad (\text{A.17})$$

donde  $NPG_x$  y  $NPG_y$  son el número de puntos de integración en las direcciones espaciales del elemento de referencia  $\xi$  y  $\eta$  respectivamente (en éste caso los puntos de integración coinciden con la regla de integración de Gauss);  $W_i$  y  $W_j$  son los valores de peso y  $(\xi_i, \eta_j)$  es la ubicación de cada punto de Gauss [133].

**Discretización del Modelo de Oseointegración**

Específicamente, para las ecuaciones (6.1-6.8) que componen el modelo mecanobiológico de la oseointegración de un implante dental, la aplicación de los principios de discretización antes descritos permite obtener el sistema de ecuaciones no lineales discretizado en tiempo y en espacio dado por A.18, donde las variables  $\mathbf{T}$ ,  $\mathbf{F}$ ,  $\mathbf{f}$ ,  $\mathbf{C}_o$ ,  $\mathbf{Q}_o$ ,  $\mathbf{G}$ ,  $\mathbf{U}$  y  $\mathbf{O}$  corresponden las seis variables del modelo, es decir, trombina, fibrinógeno, fibrina, células osteogénicas, químico osteogénico, tejido granular, desplazamientos de la matriz y osteogénesis. Las matrices  $\mathbf{M}^{(e)}$  y  $\mathbf{K}^{(e)}$ , y el vector  $\mathbf{R}^{(e)}$  son como en A.7. La matriz  $\mathbf{B}$  corresponde a la *matriz de deformaciones elementales* [133] mientras el vector  $\mathbf{A}_t$  es el *vector de tracciones elementales* [127]. Las matrices  $\mathbf{D}$  y  $\bar{\mathbf{D}}$  son respectivamente la *matriz de constantes elásticas* y la *matriz de constantes viscosas* para el caso de un cuerpo bidimensional sometido a deformación plana [133].

$$\mathbf{M}^{(e)} \frac{d\mathbf{T}}{\Delta t} + D_T \mathbf{K}^{(e)} \mathbf{T} - (k_1 - k_2 T - k_6 T F^2) \mathbf{R}^{(e)} = 0 \quad (\text{A.18a})$$

$$\mathbf{M}^{(e)} \frac{d\mathbf{F}}{\Delta t} + D_F \mathbf{K}^{(e)} \mathbf{F} - (k_3 - k_4 F - k_5 T + k_6 T F^2) \mathbf{R}^{(e)} = 0 \quad (\text{A.18b})$$

$$\begin{aligned} \mathbf{M}^{(e)} \frac{d\mathbf{f}}{\Delta t} - \left[ \frac{\alpha f_{max}(1 - \exp(-\alpha t - \beta f))}{1 - \beta f_{max} \exp(-\alpha t - \beta f)} \right] \left[ \frac{F^n}{F^n + W_F^n} \right] \mathbf{R}^{(e)} \\ + P_{max} \left[ \frac{W_P^n}{f^n + W_P^n} \right] \mathbf{R}^{(e)} = 0 \end{aligned} \quad (\text{A.18c})$$

$$\begin{aligned} \mathbf{M}^{(e)} \frac{d\mathbf{C}_o}{\Delta t} + D_{C_o} \mathbf{K}^{(e)} \mathbf{C}_o - H_{C_o} C_o \mathbf{K}^{(e)} \mathbf{Q}_o - r_{C_o} \left[ \frac{Q_o^n}{Q_o^n + W_{Q_o}^n} \right] \mathbf{R}^{(e)} \\ + \delta_{C_o} C_o \mathbf{R}^{(e)} = 0 \end{aligned} \quad (\text{A.18d})$$

$$\begin{aligned} \mathbf{M}^{(e)} \frac{d\mathbf{Q}_o}{\Delta t} + D_{Q_o} \mathbf{K}^{(e)} \mathbf{Q}_o - \left[ r_{Q_o} C_o - r_{QD} \left[ \frac{f^n}{f^n + W_f^n} \right] \right] \mathbf{R}^{(e)} \\ + [\delta_{Q_o} Q_o + \delta_{QC} C_o Q_o] \mathbf{R}^{(e)} = 0 \end{aligned} \quad (\text{A.18e})$$

$$\mathbf{M}^{(e)} \frac{d\mathbf{G}}{\Delta t} - [r_G F - \delta_G G] \left[ \frac{C_o^n}{C_o^n + W_{C_o}^n} \right] \mathbf{R}^{(e)} = 0 \quad (\text{A.18f})$$

$$\mathbf{C}^{(e)} \mathbf{U} + \bar{\mathbf{C}}^{(e)} \frac{d\mathbf{U}}{\Delta t} + \mathbf{A}^{(e)} = 0 \quad (\text{A.18g})$$

$$\mathbf{M}^{(e)} \mathbf{O} - [1 - \exp(-\beta_{C_o} C_o - \beta_{Q_o} Q_o)] \left[ \frac{W_u^n}{U^n + W_u^n} \right] \mathbf{R}^{(e)} = 0 \quad (\text{A.18h})$$

donde los diferentes parámetros corresponden con los parámetros descritos en el capítulo 6 y

analizados en detalle en el apéndice E. Adicionalmente, se utiliza lo siguiente:

$$\mathbf{C}^{(e)} = C^{ij} = \int_{\Omega} \mathbf{B}^T \cdot \mathbf{D} \cdot \mathbf{B} d\Omega \quad (\text{A.19a})$$

$$\bar{\mathbf{C}}^{(e)} = \bar{C}^{ij} = \int_{\Omega} \mathbf{B}^T \cdot \bar{\mathbf{D}} \cdot \mathbf{B} d\Omega \quad (\text{A.19b})$$

$$\mathbf{A}^{(e)} = A^{ij} = \int_{\Omega} \mathbf{B}^T \mathbf{A}_t d\Omega \quad (\text{A.19c})$$

La solución final del modelo se obtiene expresando las ecuaciones [A.18](#) en su forma [A.9](#) equivalente y resolviendo para el dominio bidimensional mostrado en la figura [6.1](#).

## APENDICE B

### PARÁMETROS DEL MODELO DE COAGULACIÓN

Las ecuaciones (5.2a) y (5.2B) fueron adimensionalizadas utilizando las siguientes escalas [65]:

$$t = \bar{t} \cdot t_{ref} \quad (\text{B.1})$$

$$x = \bar{x} \cdot L_{ref} \quad (\text{B.2})$$

$$T = u \cdot T_{ref} \quad (\text{B.3})$$

$$F = v \cdot F_{ref} \quad (\text{B.4})$$

En las expresiones (B.1) a (B.4),  $u$ ,  $v$ ,  $\bar{t}$  y  $\bar{x}$  corresponden a los valores adimensionales de trombina, fibrinógeno, tiempo y espacio respectivamente.

Utilizando estas escalas y reemplazando en las ecuaciones (5.2a) y (5.2b) se obtiene:

$$\frac{T_{ref}}{t_{ref}} \frac{\partial u}{\partial t} = D_T \frac{T_{ref}}{L_{ref}^2} \nabla^2 u + k_1[P] - k_2 T_{ref} u - k_6 T_{ref} F_{ref}^2 u v^2 \quad (\text{B.5})$$

$$\frac{F_{ref}}{t_{ref}} \frac{\partial v}{\partial t} = D_F \frac{F_{ref}}{L_{ref}^2} \nabla^2 v + k_4[G] + k_5 T_{ref} u + k_6 T_{ref} F_{ref}^2 u v^2 - k_3 F_{ref} v \quad (\text{B.6})$$

Multiplicando (B.5) por  $\frac{t_{ref}}{T_{ref}}$  y (B.6) por  $\frac{t_{ref}}{F_{ref}}$  y omitiendo la notación de barra de los valores adimensionales se tiene:

$$\frac{\partial u}{\partial t} = D_T \frac{t_{ref}}{L_{ref}^2} \nabla^2 u + k_1 \frac{t_{ref}}{T_{ref}} [P] - k_2 t_{ref} u - k_6 t_{ref} F_{ref}^2 u v^2 \quad (\text{B.7})$$

$$\frac{\partial v}{\partial t} = D_F \frac{t_{ref}}{L_{ref}^2} \nabla^2 v + k_4 \frac{t_{ref}}{F_{ref}} [G] + k_5 \frac{t_{ref} T_{ref}}{F_{ref}} u + k_6 t_{ref} T_{ref} F_{ref} u v^2 - k_3 t_{ref} v \quad (\text{B.8})$$

En (B.7) y (B.8) se eligen las siguientes constantes:

$$D_T \frac{t_{ref}}{L_{ref}^2} = 1 \rightarrow D_T = \frac{L_{ref}^2}{t_{ref}} \quad (\text{B.9})$$

$$k_1 \frac{t_{ref}}{T_{ref}} [P] = \delta \rightarrow k_1 = \frac{\delta T_{ref}}{t_{ref} [P]} \quad (\text{B.10})$$

$$k_2 t_{ref} = k \rightarrow k_2 = \frac{k}{t_{ref}} \quad (\text{B.11})$$

$$k_3 t_{ref} = 1 \rightarrow k_3 = \frac{1}{t_{ref}} \quad (\text{B.12})$$

$$k_4 \frac{t_{ref}}{F_{ref}} [G] = \gamma \rightarrow k_4 = \frac{\gamma F_{ref}}{t_{ref} [G]} \quad (\text{B.13})$$

$$k_5 \frac{t_{ref} T_{ref}}{F_{ref}} = k \rightarrow k_5 = \frac{k F_{ref}}{t_{ref} T_{ref}} \quad (\text{B.14})$$

$$k_6 t_{ref} F_{ref}^2 = 1 \rightarrow k_6 = \frac{1}{t_{ref} F_{ref}^2} \quad (\text{B.15})$$

$$k_6 t_{ref} T_{ref} F_{ref} = 1 \rightarrow k_6 = \frac{1}{t_{ref} T_{ref} F_{ref}} \quad (\text{B.16})$$

La constante  $D_T$  de la ecuación (B.9) corresponde a constante de difusión de la trombina calculada a partir del tiempo y la longitud de referencia. Por su parte, la constante  $k_1$  es la tasa de conversión de la protrombina en trombina,  $k_2$  es la tasa de consumo de trombina,  $k_3$  es la tasa de consumo de fibrinógeno en presencia de trombina,  $k_4$  es la tasa de producción de fibrinógeno debido a la liberación de los gránulos de las plaquetas,  $k_5$  es la tasa de producción de fibrinógeno en presencia de trombina, y  $k_6$  es la tasa de consumo de trombina en presencia de fibrinógeno, igual a la tasa de producción de fibrinógeno por acción de la trombina.

De (B.15) y (B.16) se obtiene:

$$T_{ref} = F_{ref} = C_{ref} \quad (\text{B.17})$$

Adicionalmente, suponiendo que el nivel de concentración de protrombina es igual a la concentración de gránulos liberados por las plaquetas activadas se obtiene:



$$[P] = [G] = C_{ref} \quad (\text{B.18})$$

Utilizando (B.17) y (B.18) y reemplazando en las expresiones (B.9) - (B.16) se obtiene:

$$D_T = \frac{L_{ref}^2}{t_{ref}} \quad (\text{B.19})$$

$$k_1 = \frac{\delta}{t_{ref}} \quad (\text{B.20})$$

$$k_2 = \frac{k}{t_{ref}} \quad (\text{B.21})$$

$$k_3 = \frac{1}{t_{ref}} \quad (\text{B.22})$$

$$k_4 = \frac{\gamma}{t_{ref}} \quad (\text{B.23})$$

$$k_5 = \frac{k}{t_{ref} T_{ref}} \quad (\text{B.24})$$

$$k_6 = \frac{1}{t_{ref} C_{ref}^2} \quad (\text{B.25})$$

Reemplazando en (B.7) y (B.8) los resultados dados en (B.19)-(B.25) se obtiene:

$$\frac{\partial u}{\partial t} = \nabla^2 u + \delta - ku - uv^2 \quad (\text{B.26})$$

$$\frac{\partial v}{\partial t} = d\nabla^2 v + \gamma + ku + uv^2 - v \quad (\text{B.27})$$

En (B.27) el parámetro  $d$  es igual a  $\frac{D_F}{D_T}$ . Las expresiones (B.26) y (B.27) conforman el modelo matemático adimensional de la reacción cinética de la trombina y el fibrinógeno. Los valores de las constantes  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $k$  y  $d$  se obtienen mediante la estabilidad numérica de la solución, mediante análisis de la literatura y en los casos en los cuales no se encontraron referencias significativas se realizaron cálculos estimados tomando como base datos relacionados. Los valores de las constantes  $k_1$  a  $k_6$  se obtuvieron a partir de estos resultados.

- $t_{ref}$ : Se ha establecido experimentalmente que el tiempo necesario para formar el coágulo final puede variar entre 0 y 20 minutos, dependiendo del tipo de lesión. En el caso de exodoncias, este tiempo es en promedio 10 minutos, aunque depende del procedimiento quirúrgico utilizado y las condiciones anatómicas del sujeto de prueba [147, 189]. Para la simulación se consideró 10 minutos como el tiempo necesario para la coagulación de la interfase hueso-implante dental.

- $L_{ref}$ : Corresponde a la mayor distancia entre el borde del hueso y el perfil acanalado del implante. De acuerdo con [146], la cantidad de tejido necrótico producto del procedimiento quirúrgico de inserción del implante es de unos 0.2 mm. Considerando un implante con pasos de rosca de 0.35 mm de espesor, el valor del parámetro es 0.55 mm.
- $T_{ref}$ : La formación del coágulo se debe a la presencia de 10 a 20 nmol/L de trombina [74]. De acuerdo con esto, y teniendo en cuenta que el peso molecular de la trombina es de 33.7 KDa [142], la concentración de trombina es en promedio 0.5055  $\mu\text{g/ml}$ .
- $F_{ref}$ : La concentración promedio de fibrinógeno en plasma es de 7.600 nM, es decir, 2.600  $\mu\text{g/ml}$  [134].
- $C_{ref}$ : La concentración de protrombina es de 100  $\mu\text{g/ml}$  [134]. Teniendo en cuenta este valor y los valores encontrados para las concentraciones de fibrinógeno y trombina, se escoge como valor del parámetro un valor medio de concentración, es decir, 1.000  $\mu\text{g/ml}$ .
- $D_T$ : La constante de difusión de la trombina es  $8.76 \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$  [142]. Sin embargo, de acuerdo a la expresión (B.9) el valor del parámetro debe ser  $5.0417 \times 10^{-4} \text{ mm}^2/\text{s}$ , resultado que fue finalmente usado.
- $D_F$ : Utilizando la ecuación de difusión de Einstein, tomando el radio de la molécula de fibrinógeno del orden de  $10 \text{ \AA}$  [143] y la viscosidad de la sangre igual a  $0.0038 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  [144], se obtiene una constante de difusión de fibrinógeno de  $5.647 \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{s}$ .
- $d$ : De la expresión (B.27) el valor del parámetro es igual a  $\frac{D_F}{D_T}$ . Realizando esta operación se obtiene  $d=0.1120$ . No obstante, pruebas numéricas garantizan estabilidad del modelo al usar el valor 0.08.
- $\delta$ : A partir de resultados experimentales el factor de conversión de la protrombina en trombina es del orden de  $\text{ng/ml}\cdot\text{s}$  [46]. De acuerdo a esto el valor del parámetro se estimó en 1.2.
- $\gamma$ : Este parámetro está relacionado con la cantidad de fibrinógeno que es liberado por las plaquetas activadas durante la coagulación. Pruebas experimentales han permitido establecer que  $10^{11}$  plaquetas liberan entre 3 y 25 mg de fibrinógeno [190]. Según ensayos de activación plaquetaria, en una concentración de plaquetas de  $200 \times 10^9$  células por

litro la tasa de activación es de 0.128 %/minuto [141]. Ajustando la concentración de plaquetas al valor normal ( $300 \times 10^9$  células por litro [70]) y al porcentaje de activación, el factor de aumento en la concentración de fibrinógeno debido a la activación de las plaquetas es de 225 ng/ml-s. Realizando la adimensionalización, y teniendo en cuenta que el 10 % del fibrinógeno está presente en los gránulos liberados por las plaquetas [72], el parámetro  $\gamma$  es igual a 0.052. Para las simulaciones éste valor se ajustó a 0.03.

- $k$ : Este parámetro se obtiene dividiendo el factor de activación de fibrinógeno entre la concentración promedio de fibrinógeno, equivalente a la tasa de consumo de trombina. Usando los valores para fibrinógeno ya discutidos, y teniendo en cuenta la discusión para el valor del factor de activación  $\gamma$ , el valor del parámetro adimensional buscado se encuentra en el rango 0.03 - 0.138. El valor usado es 0.06.

La ecuación (5.3) se implementó en su forma dimensional. Los parámetros usados son los siguientes:

- $f_{max}$ : En un coágulo formado con una concentración de fibrinógeno de 2.5 g/l sólo el 0.25 % del volumen corresponde a fibrina. Es decir, en este coágulo 0.25 g de cada 100 ml son fibrina [115], lo que equivale a una concentración de 2.5 mg/ml.
- $\alpha$ : La tasa de polimerización de un monómero de fibrina es  $111 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  [71]. Una fibra de fibrina está compuesta por 100 o más protofibrillas y cada protofibrilla está compuesta por dos monómeros [145]. Asumiendo que en el coágulo las fibras en promedio tienen 200 protofibrillas cada una, la tasa de polimerización de una fibra de fibrina es de al menos  $0.444 \text{ s}^{-1}$ . En las simulaciones este valor se ajustó a  $0.5 \text{ s}^{-1}$ .
- $\epsilon$ : Un estudio de la cinética de polimerización del fibrinógeno determinó su tasa de polimerización en  $23 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  [71]. Teniendo en cuenta la concentración promedio de fibrinógeno, su factor de activación se estima en 598 ng/ml-s.
- $\beta$ : Para el cálculo de este parámetro se definió la siguiente relación:

$$\beta = \frac{10\gamma T_{ref}}{\frac{\epsilon}{\frac{f_{max}}{\alpha}}} \quad (\text{B.28})$$

Reemplazando los demás términos de la expresión, el valor del parámetro  $\beta$  es 0.4 ml/mg. Sin embargo, la estabilidad de la ecuación (5.3) depende de la relación:

$$1 - \beta \cdot f_{max} > 0 \tag{B.29}$$

de donde se obtiene que  $\beta$  debe ser menor que 0.4. Por esta razón el valor del parámetro finalmente utilizado en las simulaciones es 0.37.

- $w$ : Se asume que la formación de la red de fibrina hereda el patrón de transformación del fibrinógeno a medida que éste evoluciona en el tiempo. Para mantener esto, la función de activación de fibrina está referenciada al valor medio de concentración del fibrinógeno, es decir, 2.5 mg/ml. Realizando la corrección de unidades, el valor del parámetro es 1.
- $p$ : Diferentes pruebas numéricas permitieron establecer un rango para este parámetro entre 10 y 30. Para disminuir el gasto computacional se prefirió usar el valor  $p=10$ .

## APENDICE C

### PARÁMETROS DEL MODELO DE COAGULACIÓN: CASO TROMBOCITOSIS

- $\gamma$ : Para el caso de trombocitosis se supone una concentración de plaquetas igual a  $1.000 \times 10^9$  células por litro [150]. Con base en los resultados experimentales de la activación de las plaquetas [141] y realizando el ajuste en la concentración y el porcentaje de activación, se obtiene el valor 2.500 ng/ml·s. Realizando la adimensionalización el valor del parámetro buscado es 0.577. Sin embargo, este valor causa saturación de la solución numérica. Comparando este valor con el encontrado para el caso de concentración normal de plaquetas se observa una diferencia de un orden de magnitud. Para garantizar esta diferencia y evitar la saturación el valor del parámetro usado es 0.1.
- $\beta$ : A partir de la expresión (B.28) y el valor de  $\gamma$  calculado para trombocitosis, el nuevo valor para  $\beta$  es 4.4548. No obstante, este valor está por fuera del rango de estabilidad definido por la expresión (B.29), razón por la cual se conserva el valor de  $\beta$  igual a 0.37.

## APENDICE D

### PARÁMETROS DEL MODELO DE COAGULACIÓN: CASO TROMBOCITOPENIA

Los siguientes son los parámetros usados en la simulación de trombocitopenia. Los parámetros que no se discuten a continuación conservan los valores mencionados en el apéndice A.

- $\gamma$ : Para el caso de trombocitopenia se supone una concentración de plaquetas igual a  $20 \times 10^9$  células por litro [137, 149]. Con base en los resultados experimentales de la activación de las plaquetas [141] y realizando el ajuste en la concentración y el porcentaje de activación, se obtiene el valor 3.33 ng/ml-s. Realizando la adimensionalización el valor del parámetro buscado es  $7.7 \times 10^{-4}$ . En las simulaciones el valor usado es  $8.0 \times 10^{-4}$
- $\beta$ : A partir de la expresión (B.29) y el valor de  $\gamma$  calculado para trombocitopenia, el nuevo valor para  $\beta$  es  $5.9 \times 10^{-3}$ . En las simulaciones el valor usado es  $5.2 \times 10^{-3}$ .

## APENDICE E

### PARÁMETROS DEL MODELO DE OSEOINTEGRACIÓN

Los valores de los parámetros del modelo se obtuvieron de la revisión de la literatura disponible. En los casos en los cuales no se encontraron referencias significativas se realizaron cálculos estimados tomando como base datos relacionados y se analizó la estabilidad numérica de la solución.

#### **Fibrinógeno, trombina y fibrina:**

Los parámetros de estas ecuaciones fueron tomados del modelo de coagulación presentado en el capítulo 5 y referidos en el apéndice A [160]. La constante de difusión de la trombina  $D_T$  es  $8.76 \times 10^{-5}$  mm<sup>2</sup>/s [142]. Sin embargo, este valor fue ajustado a las características dimensionales del problema y finalmente se utilizó el valor  $5.0417 \times 10^{-4}$  mm<sup>2</sup>/s. La constante de difusión del fibrinógeno  $D_F$  fue calculada a partir de la ecuación de difusión de Einstein para valores conocidos de la molécula de fibrinógeno y la viscosidad de la sangre [143, 144]. El valor del parámetro es  $5.647 \times 10^{-5}$  mm<sup>2</sup>/s. Los valores de las constantes  $k_1 - k_6$  son respectivamente  $2.0 \times 10^{-3}$  mg/(ml·s),  $102 \times 10^{-6}$  s<sup>-1</sup>,  $50 \times 10^{-6}$  mg/(ml·s),  $1.7 \times 10^{-3}$  s<sup>-1</sup>,  $102 \times 10^{-6}$  s<sup>-1</sup>, y  $1.7 \times 10^{-3}$  s<sup>-1</sup> [160]. El coeficiente de degradación  $P_{max}$  fue estimado a partir de los resultados experimentales reportados en [158] para la degradación de la fibrina por acción de la plasmina. Realizando correcciones del tiempo de degradación (2 días) y la concentración final de fibrina (60 % de la inicial [158]) al final del período de degradación (4 días), el valor

del parámetro es  $2.5 \times 10^{-4}$  mg/ml. Por otra parte, la concentración máxima de fibrina  $f_{max}$  obtenida experimentalmente mediante análisis de composición de un coágulo de sangre es 2.5 mg/ml [115]. La tasa de activación de fibrina  $\alpha$  fue calculada a partir de valores de composición de la fibrina y tasas de polimerización reportadas en [71, 145], de donde se obtiene el valor  $0.5 \text{ s}^{-1}$ . Finalmente, a partir de un análisis dimensional se obtiene el factor de calidad de sangre  $\beta$  como 0.4 mg/ml (Apéndice A) [160].

## Células y Químico Osteogénico:

La constante de difusión de las células osteogénicas  $D_{C_o}$  y la constante de difusión del químico osteogénico  $D_{Q_o}$  fueron estimadas a partir de los resultados numéricos reportados en [33, 65, 191] como  $1.02 \times 10^{-5} \text{ mm}^2/\text{min}$  y  $2.88 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{min}$  respectivamente. El coeficiente de sensibilidad quimiotáctica  $H_{Q_o}$  fue estimado inicialmente en  $6.95 \times 10^{-4} \text{ mm}^2/\text{min}$  (ml/mg) [33]. Mediante ensayos numéricos este valor se ajustó en  $2 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{min}$  (ml/mg). Por su parte, la tasa de proliferación celular  $r_{C_o}$  fue ajustada a partir de [65] en  $3.57 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  mientras la tasa de producción de químico osteogénico  $r_{Q_o}$  fue estimada numéricamente en  $1 \times 10^{-6} \text{ min}^{-1}$ . El coeficiente de producción de químico osteogénico por parte de las plaquetas  $r_{QD}$  fue estimado a partir de la concentración normal de plaquetas en sangre [68], la tasa de activación de plaquetas [141] y el porcentaje de proteínas liberadas por las plaquetas activadas [190]. El valor estimado para este parámetro es  $5.76 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ .

A partir de observaciones experimentales [157] se ha determinado un coeficiente de adhesión de plaquetas sobre sustratos rugosos de  $90 \times 10^{-3} \text{ células}/\text{mm}^2$ . Utilizando este resultado y el valor del parámetro  $r_{QD}$ , se obtiene un valor para el coeficiente de producción superficial de químico osteogénico  $r_{QI}$  igual a  $1.6 \times 10^{-4} \text{ mg}/(\text{ml} \cdot \text{min})$ . El coeficiente de saturación celular  $C_i$  fue ajustado en  $1 \times 10^{-3} \text{ células}/\text{ml}$  debido a que la densidad celular se supone normalizada [125]. Por otra parte, el coeficiente de muerte celular  $\delta_{C_o}$  es ajustado a partir de [191] como  $1.388 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$  mientras el coeficiente de decaimiento del químico osteogénico  $\delta_{Q_o}$  es determinado a partir de la vida media de algunos factores de crecimiento [192] y el valor reportado por [33]. Mediante ajustes numéricos el valor del parámetro es  $2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ . Finalmente, el coeficiente de consumo de químico osteogénico por parte de las células osteogénicas  $\delta_{QC}$  es calculado a partir de la tasa de proliferación celular  $r_{C_o}$  y una concentración de referencia



para el químico osteogénico [65], de donde el valor del parámetro es  $3 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1} \text{ (ml/mg)}$ .

### Tejido Granular:

La concentración inicial de fibroblastos encargados de producir colágeno es  $1 \times 10^4$  células/ml [191]. De acuerdo con [16] el tejido granular se caracteriza por la presencia de colágeno tipo I. Por lo tanto, la tasa de conversión del precursor de colágeno en colágeno tipo I puede ser considerada como la tasa de conversión del tejido granular. Según [193] esta tasa de conversión es de  $6.597 \times 10^{-13} \text{ mg/(célula} \cdot \text{min)}$ . Si el 80% del procolágeno se convierte en colágeno tipo I [193], la tasa de producción de tejido granular  $r_G$  normalizada respecto a la concentración de colágeno (100 mg/ml [191]) es de  $8.33 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1} \text{ (ml/mg)}$ . Por otro lado, de acuerdo con [194] el (pro)-colágeno se degrada a una tasa equivalente al 35% del (pro)-colágeno producido. Si la tasa de producción de procolágeno es 40 moléculas/(célula·s), normalizando respecto a la concentración de fibrinógeno transformado en fibrina [74, 160] el valor de la constante de degradación del tejido granular  $\delta_G$  es  $1.235 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1} \text{ (ml/mg)}$ .

### Desplazamientos:

Pruebas experimentales han permitido caracterizar mecánicamente las fibras de fibrina que componen el coágulo de sangre [115, 195]. A partir de estos resultados se asume para el módulo de Young  $E_{max}$  el valor 650 y para el módulo de Poisson  $\nu_{max}$  el valor 0.3. En el caso de la condición de contorno definida por la expresión (6.10) se asume para  $E_{min}$  el valor  $1 \times 10^{-3} \text{ N/m}^2$  y para  $\nu_{min}$  la quinta parte de  $\nu_{max}$ . Considerando que la fibrina posee un comportamiento mecánico similar al de un polímero elástico [115], los coeficientes de Lamé  $\mu_1$  y  $\mu_2$  son tomados iguales al módulo de viscosidad a cortante reportado por [196], es decir, 0.3 Pa·s. Finalmente, con base en los valores reportados por [127, 155] el coeficiente de saturación  $\lambda_{C_o}$  y la constante de tracción celular individual  $\tau_{C_o}$  son  $0.8 \text{ (ml/mg)}^{-1}$  y  $0.8 \text{ (N/m}^2) \cdot \text{(ml/mg)}$  respectivamente.

## Osteogénesis:

Para los parámetros de la ecuación (6.8) se realizaron pruebas experimentales complementarias al modelo acá presentado usando cultivos de células osteoblásticas sobre sustratos con superficies similares a las encontradas en implantes dentales comerciales (Capítulo 7). A partir de estas pruebas se relacionó el coeficiente  $\beta_{C_o}$  con un parámetro de adhesión de células osteoblásticas y el coeficiente  $\beta_{Q_o}$  con un parámetro de proliferación celular. De los resultados experimentales se obtuvo una correlación entre la adhesión y la proliferación celular con un coeficiente de 75. De acuerdo a esto, ensayos numéricos permitieron verificar que esta correlación se mantiene en el modelo matemático, de manera que los valores para  $\beta_{C_o}$  y  $\beta_{Q_o}$  son 1 y 75 respectivamente.

## Valores de activación:

En las ecuaciones (6.1) a (6.8) se utilizan funciones de activación para activar o inhibir el comportamiento de ciertos términos respecto al valor umbral de una sustancia de control [121, 125]. En total, en el modelo presentado se han utilizado seis funciones de activación cada una asociada a una sustancia de control y un parámetro umbral, resumidos en la tabla E.1. Los valores de estos parámetros umbrales fueron obtenidos mediante ensayos numéricos. El parámetro  $n$  que acompaña a estas seis funciones de activación está relacionado con la pendiente de la curva en el valor umbral. En todos los casos el valor de  $n$  es 10.

| Parámetro | Sustancia Activadora    | Valor                      |
|-----------|-------------------------|----------------------------|
| $W_F$     | Fibrinógeno             | 1.2 (mg/ml)                |
| $W_P$     | Fibrina (Degradación)   | 1.8 (mg/ml)                |
| $W_{Q_o}$ | Químico Osteogénico     | $1 \times 10^{-3}$ (mg/ml) |
| $W_f$     | Fibrinógeno (Plaquetas) | 2.3 (mg/ml)                |
| $W_{C_o}$ | Células Osteogénicas    | 0.8 (células/ml)           |
| $W_U$     | Desplazamientos         | $3 \times 10^{-4}$ (m)     |

Tabla E.1: Valores de los parámetros umbral usados en las funciones de activación.

- [1] ADELL R, LEKHOLM U, ROCKLER B & BRANEMARK P. *15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw*. Journal of Oral Surgery, 10: **1981**; 387–416.
- [2] BRANEMARK R, BRANEMARK P, RYDEVIK B & MYERS R. *Osseointegration in skeletal reconstruction and rehabilitation. A review*. Journal of Rehabilitation Research and Development, 38(2): **2001**; 175–181.
- [3] BRANEMARK P, BREINE U, ADELL R, HANSSON O, LINDSTÖM J & OHLSSON A. *Intra-osseous anchorage of dental prostheses I. Experimental studies*. Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery, 3: **1969**; 81–100.
- [4] BRANEMARK P. *Osseointegration and its experimental background*. Journal of Prosthetic Dentistry, 50(3): **1983**; 399–410.
- [5] GAPSKI R, WANG H, MASCARENHAS P & LANG N. *Critical review of immediate implant loading*. Clinical Oral Implants Research, 14: **2003**; 515–527.
- [6] STANFORD C & SCHNEIDER G. *Functional behavior of bone around dental implants*. Gerodontology, 21: **2004**; 71–77.
- [7] SCHICHO K, KASTNER J, KLINGESBERGER R, SEEMANN R, ENISLIDIS G, UNDT G, WANSCHITZ F, FIGL M, WAGNER A & EWERS R. *Surface area analysis of dental implants using micro-computed tomography*. Clinical Oral Implants Research, 18: **2007**; 459–464.
- [8] HOLMGREN E, SECKINGER R, KILGREN L & MANTE F. *Evaluating parameters of osseointegrated dental implants using finite element analysis*. Journal of Oral Implantology, 26(2): **1998**; 80–88.
- [9] OATES T & COCHRAN D. *Dental Applications of Bone Biology*. En: *Engineering of Functional Skeletal Tissues*, (eds.) BRONNER F, FARACH M & MIKOS A. Springer-Verlag: **2007**, págs. 129–138.
- [10] APARICIO C. *Tratamientos de superficie sobre titanio comercialmente puro para la mejora de la osteointegración de los implantes dentales*. Tesis Doctoral, Universitat Politècnica de Catalunya. Barcelona, España.: **2005**.
- [11] JOOS U & MEYER U. *New paradigm in implant osseointegration*. Head and Face Medicine, 2(19): **2006**; 1–2.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [12] SCHENK R & BUSER D. *Osseointegration: A reality*. Periodontology 2000, 17: **1998**; 22–35.
- [13] HANSSON H, ALBREKTSSON T & BRANEMARK P. *Structural aspects of the interface between tissue and titanium implants*. Journal of Prosthetic Dentistry, 50(1): **1983**; 108–113.
- [14] LISTGARTEN M, BUSER D, STEINEMANN S, DONATH K, LANG N & WEBER H. *Light and transmission electron microscopy of the intact interfaces between nonsubmerged titanium-coated epoxy resin implants and bone or gingiva*. Journal of Dental Research, 71: **1992**; 364–371.
- [15] AUKHIL I. *Biology of wound healing*. Periodontology 2000, 22: **2000**; 44–50.
- [16] HÄKKINEN L, UITTO V & LARJAVA H. *Cell biology of gingival wound healing*. Periodontology 2000, 24: **2000**; 127–152.
- [17] COCHRAN D & WOZNEY J. *Biological mediators for periodontal regeneration*. Periodontology 2000, 19: **1999**; 40–58.
- [18] KLEIN-NULEND J, BACABAC R & MULLENDER M. *Mechanobiology of bone tissue*. Pathologie Biologie, 53: **2005**; 576–580.
- [19] DAVIES J. *Bone bonding at natural and biomaterial surfaces*. Biomaterials, 28: **2007**; 5058–5067.
- [20] LIU X, CHU P & DING C. *Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications*. Materials Science and Engineering Research, 47: **2004**; 49–121.
- [21] KASEMO B. *Biological surface science*. Surface Science, 500: **2002**; 656–677.
- [22] LANDOR I, VAVRIK P, SOSNA A, JAHODA D, HAHN H & DANIEL M. *Hydroxyapatite porous coating and the osteointegration of the total hip replacement*. Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery, 127: **2007**; 81–89.
- [23] LANG N, ARAUJO M & KARRING T. *Alveolar Bone Formation*. En: *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, (eds.) LINDHE J, KARRING T & LANG N. Blackwell Munksgaard: **2003**, págs. 866–896.
- [24] DAVIES J. *Understanding peri-implant endosseous healing*. Journal of Dental Education, 67(8): **2003**; 932–949.
- [25] SIKAVITSAS V, TEMENOFF J & MIKOS A. *Biomaterials and bone mechanotransduction*. Biomaterials, 22: **2001**; 2581–2593.
- [26] ELLINGSEN J, THOMSEN P & LYGSTADAAS P. *Advances in dental implant materials and tissue regeneration*. Periodontology 2000, 41: **2006**; 136–156.
- [27] WENNERBERG A, ALBREKTSSON T & LINDHE J. *Surface Topography of Titanium Dental Implants*. En: *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, (eds.) LINDHE J, KARRING T & LANG N. Blackwell Munksgaard: **2003**, págs. 821–828.
- [28] JOOS U, WIESMANN H, SZUWART T & MEYER U. *Mineralization at the interface of implants*. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 35: **2006**; 783–790.
- [29] VAN DER MEULEN M & HUISKES R. *Why mechanobiology? A survey article*. Journal of Biomechanics, 35: **2002**; 401–414.

- [30] PATRA A, DEPAOLO J, D'SOUZA K, DETALLA D & MEENAGHAN M. *Guidelines for analysis and redesign of dental implants*. *Implant Dentistry*, 7(4): **1998**; 355–366.
- [31] GENG J & TAN LG KBC AND. *Application of finite element analysis in implant dentistry: A review of literature*. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 85: **2001**; 585–598.
- [32] AMBARD D & SWIDER P. *A predictive mechano-biological model of the bone-implant healing*. *European Journal of Mechanics and Solids*, 25: **2006**; 927–937.
- [33] MOREO P, GARCÍA-AZNAR J & DOBLARÉ M. *Bone ingrowth on the surface of endosseous implants. Part I: Mathematical model*. *Journal of Theoretical Biology*, 260: **2009**; 1–12.
- [34] ALBREKTSSON T & JOHANSSON C. *Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration*. *European Spine Journal*, 10: **2001**; S96–S101.
- [35] COOPER L. *Biological determinants of bone formation for osseointegration: Clues for future clinical improvements*. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 80(4): **1998**; 439–449.
- [36] MATSUNO H, YOKOYAMA A, WATARI F, UO M & KAWASAKI T. *Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium*. *Biomaterials*, 22: **2001**; 1253–1262.
- [37] LINDHE J, KARRING T & ARAUJO M. *Anatomy of the Periodontium*. En: *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, (eds.) LINDHE J, KARRING T & LANG N. Blackwell Munksgaard: **2003**, págs. 3–49.
- [38] SAFFAR J, LASFARGUES J & CHERRUAU M. *Alveolar bone and the alveolar process: The socket that is never stable*. *Periodontology 2000*, 13: **1997**; 76–90.
- [39] PULEO D & NANCI A. *Understanding and controlling the bone-implant interface*. *Biomaterials*, 20: **1999**; 2311–2321.
- [40] MOORE K. *Clinically Oriented Anatomy*. Lippincott Williams and Wilkins: **1999**.
- [41] LECKHOLM U. *The Surgical Site*. En: *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, (eds.) LINDHE J, KARRING T & LANG N. Blackwell Munksgaard: **2003**, págs. 852–865.
- [42] LECKHOLM U & ZARB G. *Patient Selection and Preparation*. En: *Tissue Integrated Prostheses: Osseointegration in Clinical Dentistry*, (eds.) BRANEMARK P, ZARB G & ALBREKTSSON T. Quintessence: **1985**, págs. 199–209.
- [43] FATHI M & AZAM F. *Novel hydroxyapatite tantalum surface coating for metallic dental implant*. *Materials Letters*, 61: **2007**; 1238–1241.
- [44] HUANG Y, XIROPAIDIS A, SORENSEN R, ALBANDAR J & HALL U J AND WIKESJÖ. *Bone formation at titanium porous oxide [TiUnite] oral implants in type IV bone*. *Clinical Oral Implants Research*, 16: **2005**; 105–111.
- [45] MARTÍNEZ J, SÁNCHEZ C, TRAPERO C, MARTÍNEZ M & GARCÍA F. *Diseño de los implantes dentales: estado actual*. *Avances en Periodoncia*, 14(3): **2002**; 129–136.
- [46] WHICKER T. *Glossary of implant terms. AAID Nomenclature Committee*. *Journal of Oral Implantology*, 16(1): **1990**; 57–63.

- [47] RIEGER M, ADAMS M & KINZEL G. *Finite element analysis of eleven endosseous implants*. Journal of Prosthetic Dentistry, 63(4): **1990**; 457–465.
- [48] ADELL R, HANSSON B, BRANEMARK P & BREINE U. *Intra-osseous anchorage of dental prostheses II. Review of clinical approaches*. Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery, 4: **1970**; 19–34.
- [49] RATNER B, HOFFMAN A, SHOEN F & LEMONS J. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Science*. Academic Press, San Diego: **1996**.
- [50] WATARI F, YOKOYAMA A, OMORI A, HIRAI T, KONDO H, UO M & KAWASAKI T. *Biocompatibility of materials and development to functionally graded implant for biomedical application*. Composites Science and Technology, 64: **2004**; 893–908.
- [51] NIINOMI N. *Fatigue characteristics of metallic biomaterials*. Journal of Fatigue, 29: **2007**; 992–1000.
- [52] METIKOS-HUKOVIC M, KWOKAL A & PILJAC J. *The influence of niobium and vanadium on passivity of titanium-based implants in physiological solution*. Biomaterials, 24: **2003**; 3765–3775.
- [53] NIINOMI N. *Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods*. Science and Technology of Advanced Materials, 4: **2003**; 445–454.
- [54] OONISHI H. *Mechanical and chemical bonding of artificial joints*. Clinical Materials, 5(2): **1990**; 217–233.
- [55] FRAGISKOS F & ALEXANDRIDIS C. *Osseointegrated Implants*. En: *Oral Surgery*, (eds.) FRAGISKOS F & ALEXANDRIDIS C. Springer Berlin Heidelberg: **2007**, págs. 337–348.
- [56] HEYDENRIJK K, RAGHOEBAR G, MEIJER H, VAN DER REIJDEN W, VAN WINKELHOFF A & STEGENGA B. *Two-stage IMZ implants and ITI implants inserted in a single-stage procedure. A prospective comparative study*. Clinical Oral Implants Research, 13: **2002**; 371–380.
- [57] SATOMI K, AKAGAWA Y, NIKAI H & TSURU H. *Bone-implant interface structures after nontapping and tapping insertion of screw-type titanium alloys endosseous implants*. Journal of Prosthetic Dentistry, 59: **1988**; 339–342.
- [58] ERIKSSON A & ALBREKTSSON T. *Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: a vitalmicroscopic study in the rabbit*. Journal of Prosthetic Dentistry, 50: **1983**; 101–107.
- [59] ALBREKTSSON T, BERGLUNDH T & LINDHE J. *Implant Concepts: Historic Background and Current Concepts*. En: *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, (eds.) LINDHE J, KARRING T & LANG N. Blackwell Munksgaard: **2003**, págs. 809–820.
- [60] SIEBERS M, BRUGGE P, WALBOOMERS X & JANSEN J. *Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials: A critical review*. Biomaterials, 26: **2005**; 137–146.
- [61] SCHWARZ M. *Mechanical complications of dental implants*. Clinical Oral Implants Research, 11(Supl. 1): **2000**; 156–158.
- [62] MEYER U & WIESMANN H. *Bone and Cartilage Engineering*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg: **2006**.
- [63] KIM Y, KIM J, KIM Y & RHO J. *Effects of organic matrix proteins on the interfacial structure at the bone-biocompatible nacre interface in vitro*. Biomaterials, 23: **2002**; 2089–2096.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [64] LEMONS J. *Unanticipated outcomes: dental implants*. *Implant Dentist*, 7(4): **1998**; 351–353.
- [65] BAILON-PLAZA A & VAN DER MEULEN M. *A mathematical framework to study the effects of growth factor influences on fracture healing*. *Journal of Theoretical Biology*, 212: **2001**; 191–209.
- [66] SODEK J & MCKEE M. *Molecular and cellular biology of alveolar bone*. *Periodontology 2000*, 24: **2000**; 99–126.
- [67] SFEIR C, HO L, DOLL B, AZARI K & HOLLINGER J. *Fracture Repair*. En: *Bone Regeneration and Repair. Biology and Clinical Applications*, (eds.) LIEBERMAN J & FRIEDLAENDER G. Humana Press: **2005**, págs. 21–42.
- [68] PASI K. *Hemostasis*. En: *Hemostasis and Thrombosis Protocols*, (eds.) PERRY D & PASI K. Humana Press: **1999**, págs. 3–24.
- [69] POLIMENI G, XIROPAIDIS A & WIKESJO U. *Biology and principles of periodontal wound healing-regeneration*. *Periodontology 2000*, 41: **2006**; 30–47.
- [70] MINORS D. *Haemostasis, blood platelets and coagulation*. *Anaesthesia and intensive care medicine*, 8(5): **2007**; 214–216.
- [71] GORKUN O, VEKLIH Y, WEISEL J & LORD S. *The conversion of fibrinogen to fibrin: Recombinant fibrinogen typifies plasma fibrinogen*. *Blood*, 89(12): **1997**; 4407–4414.
- [72] HANDAGAMA P, SCARBOROUGH R, SHUMAN M & BAINTON D. *Endocytosis of fibrinogen into megakaryocyte and platelet  $\alpha$ -granules is mediated by Iib 3 (glycoprotein Iib-IIIa)*. *Blood*, 82(1): **1993**; 135–138.
- [73] FURIE B & FURIE B. *Thrombus formation in vivo*. *Journal of Clinical Investigation*, 115: **2005**; 3355–3362.
- [74] MANN K. *Thrombin formation*. *Chest*, 124: **2003**; 4–10.
- [75] DIMITRIOU R, TSIRIDIS E & GIANNOUDIS P. *Current concepts of molecular aspects of bone healing*. *Injury: International Journal of the Care of the Injured*, 36: **2005**; 1392–1404.
- [76] COLLEN D & LIJNEN H. *Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis*. *Blood*, 78: **1991**; 3114–3124.
- [77] LI W, HUANG E, KAARTINEN V, WARBURTON D & TUAN T. *Transforming growth factor- $\beta$ 3 affects plasminogen activator inhibitor-1 expression in fetal mice and modulates fibroblast-mediated collagen gel contraction*. *Wound Repair and Regeneration*, 14: **2006**; 516–525.
- [78] LI W, CHONG S, HUANG E & TUAN T. *Plasminogen activator/plasmin system: A major player in wound healing?* *Wound Repair and Regeneration*, 11: **2003**; 239–247.
- [79] KO C, SOMERMAN M & AN K. *Motion and Bone Regeneration*. En: *Engineering of Functional Skeletal Tissues*, (eds.) BRONNER F, FARACH M & MIKOS A. Springer-Verlag: **2007**, págs. 110–127.
- [80] GERSTENFELD L, EDGAR C, KAKAR S, JACOBSEN K & EINHORN T. *Osteogenic Growth Factors and Cytokines and their Role in Bone Repair*. En: *Engineering of Functional Skeletal Tissues*, (eds.) BRONNER F, FARACH M & MIKOS A. Springer-Verlag: **2007**, págs. 17–44.

- [81] TRAINI T, ASSENZA B, SAN-ROMAN F, THAMS U, CAPUTI S & PIATTELLI A. *Bone microvascular pattern around loaded dental implants in a canine model*. Clinical Oral Investigations, 10: **2006**; 151–156.
- [82] CARANO R & FILVAROFF E. *Angiogenesis and bone repair*. Drug Discovery Today, 8(21): **2003**; 980–989.
- [83] SAHNI A & FRANCIS C. *Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulate-endothelial cell proliferation*. Blood, 96(12): **2000**; 3772–3778.
- [84] VAILHÉ B, VITTET D & FEIGE J. *In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis*. Laboratory investigation, 81(4): **2001**; 439–452.
- [85] ENCISO J & HIRSCHI K. *Understanding abnormalities in vascular specification and remodeling*. Pediatrics, 116: **2005**; 228–230.
- [86] NÖR J & POLVERINI P. *Role of endothelial cell survival and death signals in angiogenesis*. Angiogenesis, 3: **1999**; 101–116.
- [87] TRACQUI P, NAMY P & OHAYON J. *In Vitro Tubulogenesis of Endothelial Cells: Analysis of a Bifurcation Process Controlled by a Mechanical Switch*. En: *Mathematical Modeling of Biological Systems*, (eds.) DEUTSCH A, BRUSCH L, BYME H, DE VRIES G & HERZEL H, tomo I. Springer- Birkhäuser: **2007**, págs. 47–57.
- [88] YANCOPOULOS G, DAVIS S, GALE N, RUDGE J, WIEGAND S & HOLASH J. *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. Nature, 14: **2000**; 242–248.
- [89] KUZNETSOV S, KREBSBACH P, SATOMURA K, KERR J, RIMINUCCI M & BENAYAHU D GRP. *Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblast from bone after transplantation in vitro*. Journal of Bone and Mineral Research, 12(9): **1997**; 1335–1347.
- [90] KATAGIRI T & TAKAHASHI N. *Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation*. Oral Diseases, 8: **2002**; 147–159.
- [91] ANSELME K. *Osteoblast adhesion on biomaterials*. Biomaterials, 21: **2000**; 667–681.
- [92] TORII Y, HITOMI K, YAMAGISHI Y & TSUKAGOSHI N. *Demonstration of alkaline phosphatase participation in the mineralization of osteoblasts by antisense RNA approach*. Cell Biology International, 20(7): **1996**; 459–464.
- [93] MATSUO K & IRIE N. *Osteoclast-osteoblast communication*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 473(2): **2008**; 201–209.
- [94] HOLLINGER J. *Bone Dynamics: Morphogenesis, Growth Modeling and Remodeling*. En: *Bone Regeneration and Repair. Biology and Clinical Applications*, (eds.) LIEBERMAN J & FRIEDLAENDER G. Humana Press: **2005**, págs. 1–20.
- [95] BAIN S & GROSS T. *Bone Resorption*. En: *Structural Aspects of Bone Resorption*, (eds.) BRONNER F, FARACH M & RUBIN J. Springer-Verlag: **2005**, págs. 58–66.
- [96] INGBER D. *The mechanochemical basis of cell and tissue regulation*. Mechanics and Chemistry of Biosystems, 1: **2004**; 53–68.



## BIBLIOGRAFÍA

---

- [97] BERSHADSKY A, BALLESTREM C, CARRAMUSA L, ZILBERMAN Y, GILQUIN B, KHOCHBIN S, ALEXANDROVA A, VERKHOVSKY A, SHEMESH T & KOZLOV M. *Assembly and mechanosensory function of focal adhesions: experiments and models*. European Journal of Cell Biology, 85: **2006**; 165–173.
- [98] MOREO P, GARCÍA-AZNAZ J & DOBLARÉ M. *Modeling mechanosensing and its effect on the migration and proliferation of adherent cells*. Acta Biomaterialia, 4: **2008**; 613–621.
- [99] AMBROSI D & GAMBA A. *Cell directional and chemotaxis in vascular morphogenesis*. Bulletin of Mathematical Biology, 66: **2004**; 1851–1873.
- [100] SCHWARTZ M & DESIMONE D. *Cell adhesion receptors in mechanotransduction*. Current Opinion in Cell Biology, 20(5): **2008**; 551–556.
- [101] DIMILLA P, BARBEE K & LUFFENBURGER D. *Mathematical model for the effects of adhesion and mechanics on cell migration speed*. Biophysics Journal, 60: **1991**; 15–37.
- [102] INGBER D. *Tensegrity and mechanotransduction*. Journal of Bodywork and Movement Therapies, 12: **2008**; 198–200.
- [103] KNOTHE-TATE M. *Whither flows the fluid in bone? An osteocyte's perspective*. Journal of Biomechanics, 36: **2003**; 1409–1424.
- [104] BURGER E, KLEIN-NULEND J & MULLENDER M. *Mechanobiology of Bone*. En: *Engineered Bone*, (eds.) PETITE H & QUARTO R. Landes Bioscience-Eurekah.com: **2005**, págs. 28–44.
- [105] PRENDERGAST P, HUISKES R & SOBALLE K. *Biophysical stimulation on cells during tissue differentiation at implant interfaces*. Journal of Biomechanics, 30: **1997**; 539–548.
- [106] HUISKES R, VAN DRIEL W, PRENDERGAST P & SOBALLE K. *A biomechanical regulatory model for periprosthetic fibrous-tissue differentiation*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 8: **1997**; 785–788.
- [107] ISAKSSON H, VAN DONKELAAR C, HUISKES R & ITO K. *A mechano-regulatory bone-healing model incorporating cell-phenotype specific activity*. Journal of Theoretical Biology, 252: **2008**; 230–246.
- [108] GERIS L, GERISCH A, VANDER-SLOTEN J, WEINER R & VAN-OOSTERWYCK H. *Angiogenesis in bone fracture healing: a bioregulatory model*. Journal of Theoretical Biology, 251: **2008**; 137–158.
- [109] COLIJN C & MACKEY M. *A mathematical model of hematopoiesis I. Periodic chronic myelogenous leukaemia*. Journal of Theoretical Biology, 237: **2005**; 117–132.
- [110] KHANIN M, RAKOV D & KOGAN A. *Mathematical model for the blood coagulation prothrombin time test*. Thrombosis Research, 89: **1998**; 227–232.
- [111] CUNHA-ORFAO S, JANKA G, MOTTAGHY K, WALCHER S & ZERZ E. *Qualitative properties and stability of a model for blood thrombin formation*. Journal of Mathematical Analysis and Applications, 346: **2008**; 218–226.
- [112] MANTZARIS N, WEBB S & OTHMER H. *Mathematical modeling of tumor-induced angiogenesis*. Journal of Mathematical Biology, 49: **2004**; 111–187.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [113] PREZIOSI L & ASTANIN S. *Modelling the Formation of Capillaries*. En: *Complex Sstems in Biomedicine*, (eds.) QUARTERONI A, FORMAGGIA L & VENEZIANI A. Springer: **2006**, págs. 109–145.
- [114] GARZÓN-ALVARADO D, GARCÍA-AZNAR J & DOBLARÉ M. *Appearance and location of secondary ossification centres may be explained by a reaction-diffusion mechanism*. *Computers in Biology and Medicine*, 39(6): **2009**; 554–561.
- [115] WEISEL J. *The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians*. *Biophysical Chemistry*, 112: **2004**; 267–276.
- [116] MADZVAMUSE A, WATHEN A & MAINI P. *A moving grid finite element method applied to a model biological pattern generator*. *Journal of Computational Physics*, 190: **2003**; 478–500.
- [117] GARZÓN-ALVARADO D. *Simulación de procesos de reacción-difusión: Aplicación a la morfogénesis del tejido óseo*. Tesis Doctoral, Zaragoza, España: **2007**.
- [118] MAINI P. *Using mathematical models to help understand biological pattern formation*. *Comptes Rendus Biologies*, 327(3): **2004**; 225–234.
- [119] TURING A. *The chemical basis of morphogenesis*. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 237: **1957**; 37–72.
- [120] MURRAY J. *Mathematical Biology II: Spatial models and biomedical applications*. Springer-Verlag: **1993**.
- [121] MURRAY J. *Mathematical Biology I: An introduction*. Springer-Verlag: **2002**.
- [122] VANEGAS J, LANDINEZ N & GARZÓN-ALVARADO D. *Análisis de la inestabilidad de Turing en modelos biológicos*. *Revista DYNA*. Universidad Nacional de Colombia - Medellín., 158: **2009**; 123–134.
- [123] WANG Z, LI W & RUAN S. *Travelling wave fronts in reaction-diffusion systems with spatio-temporal delays*. *Journal of Differential Equations*, 222: **2006**; 185–232.
- [124] PAGE K, MAINI P & MONK N. *Pattern formation in spatially heterogeneous Turing reaction diffusion models*. *Physica D*, 181: **2003**; 80–101.
- [125] PAINTER K. *Chemotaxis as a mechanism for morphogenesis*. Tesis Doctoral, United Kingdom: Oxford University: **1997**.
- [126] MAINI P. *Spatial pattern formation in chemical and biological systems*. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 93(20): **1997**; 3601–3610.
- [127] MURRAY J & OSTER G. *Cell traction models for generation pattern and form in morphogenesis*. *Journal of Mathematical Biology*, 19: **1984**; 265–279.
- [128] IZAGUIRRE J, CHATURVEDI R, HUANG C & CICKOVSKI T. *Compucell, a multi-model framework for simulation of morphogenesis*. *Bioinformatics*, 20: **2004**; 1129–1137.
- [129] MADZVAMUSE A. *A numerical approach to the study of spatial pattern formation*. Tesis Doctoral, Oxford, UK, Computing Laboratory. University of Oxford: **2000**.
- [130] CRAMPIN E. *Reaction diffusion patterns on growing domains*. Tesis Doctoral, Oxford, UK, Magdalen College. University of Oxford: **2000**.

- [131] RAO S. *The Finite Element Method in Engineering*. Elsevier Science and Technology Books: **2004**.
- [132] OÑATE E, MIQUEL J & ZÁRATE F. *Stabilized solution of the multidimensional advection-diffusion-absorption equation using linear finite elements*. Computers and Fluids, 36: **2007**; 1–111.
- [133] OÑATE E. *Cálculo de Estructuras por el Método de los Elementos Finitos*. CIMNE, España: **1992**.
- [134] BUTENAS S & MANN K. *Blood coagulation*. Biochemistry, 67(1): **2002**; 3–12.
- [135] NIELSEN V. *Beyond cell based models of coagulation: Analyses of coagulation with clot lifespan resistance time relationships*. Thrombosis Research, 122: **2000**; 145–152.
- [136] ZARNITSINA V, POKHILKO A & ATAULLAKHANOV F. *A mathematical model for the spatio-temporal dynamics of intrinsic pathway of blood coagulation I. The model description*. Thrombosis Research, 84(4): **1996**; 225–236.
- [137] SANTILLÁN M, MAHAFFY J, BELAIR J & MACKEY M. *Regulation of platelet production: The normal response to perturbation and cyclical platelet disease*. Journal of Theoretical Biology, 206: **2000**; 585–603.
- [138] HOFFMAN M. *A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa*. Blood Reviews, Supplement 1: **2003**; S1–S5.
- [139] DE CATERINA R, LANZA M, MANCA G, STRATA G, MAFFEI S & SALVATORE L. *Bleeding time and bleeding: An analysis of the relationship of the bleeding time test with parameters of surgical bleeding*. Blood, 84(10): **1994**; 3363–3370.
- [140] SHUEY K. *Platelet-associated bleeding disorders*. Seminars in oncology nursing, 12(1): **1996**; 15–27.
- [141] SCHULZ-HEIK K, RAMACHANDRAN J, BLUESTEIN D & JESTY J. *The extent of platelet activation under shear depends on platelet count: Differential expression of anionic phospholipid and Factor Va*. Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis, 34: **2005**; 255–262.
- [142] HARMISON C, LAKDABURU C & SEEGER W. *Some physicochemical properties of bovine thrombin*. Journal of Biological Chemistry, 236(6): **1961**; 1693–1696.
- [143] HALL C & SLAYTER H. *The fibrinogen molecule: Its size, shape, and mode of polymerization*. Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, 5(1): **1959**; 1693–1696.
- [144] LÓPEZ J, DEL CONDE I & DONG J. *Platelet Function under Flow*. En: *Platelet Function: Assessment, Diagnosis and Treatment*, (eds.) QUINN M & FITZGERALD D. Humana Press: **2005**, págs. 223–246.
- [145] HANTGAN R & HERMANS J. *Assembly of fibrin: A light scattering study*. Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, 254(22): **1979**; 11272–11281.
- [146] KASEMO B & LAUSMAA J. *The Biomaterial-Tissue Interface and its Analogues in Surface Science and Technology*. En: *The Bone-Biomaterial Interface*, (ed.) DAVIES J. University of Toronto Press: **1991**, págs. 19–32.
- [147] MALMQUIST J, CLEMENS S, OIEN H & WILSON S. *Hemostasis of oral surgery wounds with the HemCon dental dressing*. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 66: **2008**; 1177–1183.
- [148] KAUSHANSKY K. *The molecular mechanisms that control thrombopoiesis*. Journal of Clinical Investigation, 115: **2005**; 3339–3347.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [149] PATEL S, HARTWIG J & ITALIANO JR J. *The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets*. Journal of Clinical Investigation, 115: **2005**; 3348–3354.
- [150] TEFFERY A. *Thrombocytosis and essential thrombocytopenia*. En: *Platelets*, (ed.) MICHELSON A. Elsevier: **2007**, págs. 1009–1028.
- [151] MANNUCCI P. *Few platelets, many platelets: The role of the internist*. European Journal of Internal Medicine, 11: **2000**; 4–8.
- [152] DAVIES J & HOSSEINI M. *Histodynamics of Endosseous Wound Healing*. En: *Bone Engineering*, (ed.) DAVIES J. Em square incorporated, Toronto: **2000**, págs. 1–14.
- [153] WOLBERG A & CAMPBELL R. *Thrombin generation, fibrin clot formation and hemostasis*. Transfusion and Apheresis Science, 38: **2008**; 15–23.
- [154] AMOR N, GERIS L, VANDER-SLOTEN J & VAN-OOSTERWYCK H. *Modelling the early phases of bone regeneration around an endosseous oral implant*. Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering, 12(4): **2009**; 459–468.
- [155] TRANQUI L & TRACQUI P. *Mechanical signalling and angiogenesis. The integration of cell-extracellular matrix couplings*. Comptes Rendus de l'Académie des sciences, 323: **2000**; 31–47.
- [156] MANOUSSAKI D, LUBKIN S, VERNON R & MURRAY J. *A mechanical model for the formation of vascular networks in vitro*. Acta Biotheoretica, 44: **1996**; 271–282.
- [157] PARK J, GEMMELL C & DAVIES J. *Platelet interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography*. Biomaterials, 22: **2001**; 2671–2682.
- [158] GABRIEL D, MUGA K & BOOTHROYD E. *The effect of fibrin structure on fibrinolysis*. Journal of Biological Chemistry, 267(34): **1992**; 24259–24263.
- [159] BÄCHLE M & KOHAL R. *A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells*. Clinical Oral Implants Research, 15(6): **2004**; 683–92.
- [160] VANEGAS J, LANDINEZ N & GARZON-ALVARADO D. *Modelo matematico de la coagulacion en la interfase hueso-implante dental*. Revist Cubana de Investigaciones Biomédicas, 28: **2009**; 167–191.
- [161] GUÉHENNEC L, SOUEIDAN A, LAYROLLE P & AMOURIQ Y. *Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration*. Dental Materials, 23: **2007**; 844–854.
- [162] ARZATE H, ALVAREZ-PÉREZ M, ALVAREZ-FREGOSO O, WUSTERHAUS-CHÁVEZ A, REYES-GASGA J & XIMÉNEZ-FYVIE L. *Electron microscopy, micro-analysis and X-ray diffraction characterization of the mineral-like tissue deposited by human cementum tumor-derived cells*. Journal of Dental Research, 79: **2002**; 28–34.
- [163] ARZATE H, ALVAREZ-PÉREZ M, AGUILAR-MENDOZA M & ALVAREZ-FREGOSO O. *Human cementum tumor-derived cells have different features from human osteoblastic cells in-vitro*. Journal of Periodontal Research, 33: **1998**; 249–258.

- [164] HAYMAN E, ENGVALL E, A'HEARN E, BARNES D, PIERSCHBACHER M & RUOSLAHTI E. *Cell attachment on replicas of SDS polyacrylamide gels reveals two adhesive plasma proteins*. Journal of Cell Biology, 95: **1982**; 20–23.
- [165] RODIL S, OLIVARES R, ARZATE H & MUHL S. *Properties of carbon films and their biocompatibility using in-vitro tests*. Diamond and Related Materials, 12: **2003**; 931–937.
- [166] RODIL S, OLIVARES R & ARZATE H. *In vitro cytotoxicity of amorphous carbon films*. Biomedical Materials and Engineering, 15: **2004**; 101–112.
- [167] MOSMANN T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*. Journal of Immunological Methods, 65: **1983**; 55–63.
- [168] ALVAREZ-PÉREZ M, PITARU S, ALVAREZ-FREGOSO O, REYES J & ARZATE H. *Anticementoblastomade-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line*. Journal of Structural Biology, 143: **2003**; 1–13.
- [169] LOWRY O, ROBERTS N, WU M, HIXON W & CRAWFORD E. *The quantitative histochemistry of brain I. Enzyme measurement*. Journal of Biological Chemistry, 207: **1954**; 19–37.
- [170] BRADFORD M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 72: **1976**; 248–254.
- [171] GOUG J, JONES J & HENCH L. *Nodule formation and mineralisation of human primary osteoblasts cultured on a porous bioactive glass scaffold*. Biomaterials, 25: **2004**; 2039–2046.
- [172] AHMAD M, MCCARTHY M & GRONOWICZ G. *An in vitro model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant materials*. Biomaterials, 20: **1990**; 211–220.
- [173] AITA H, HORI N, TAKEUCHI M, SUZUKI T, YAMADA M, ANPO M & OGAWA T. *The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone*. Biomaterials, 30: **2009**; 1015–1025.
- [174] WASHBURN N, YAMADA K, SIMON JR C, KENNEDY S & AMIS E. *High-throughput investigation of osteoblast response to polymer crystallinity: Influence of nanometer-scale roughness on proliferation*. Biomaterials, 25: **2004**; 1215–1224.
- [175] HINKLE L, MCCAIG C & ROBINSON K. *The direction of growth of differentiating neurones and myoblasts from frog embryos in an applied electric field*. Journal of Physiology, 314: **1981**; 121–35.
- [176] FUNK R & MONSEES T. *Effects of electromagnetic fields on cells: Physiological and therapeutical approaches and molecular mechanisms of interaction. A review*. Cells Tissues Organs, 182: **2006**; 59–78.
- [177] BRUNETTE D. *Spreading and orientation of epithelial cells on grooved substrata*. Experimental Cell Research, 167: **1986**; 203–17.
- [178] MONSEES T, BARTH K, TIPPELT S, HEIDEL K, GORBUNOV A, POMPE W & FUNK R. *Effects of different titanium alloys and nanosize surface patterning on adhesion, differentiation, and orientation of osteoblast-like cells*. Cells Tissues Organs, 180: **2005**; 81–95.
- [179] FUNK R, MONSEES T & ÖZKUCUR N. *Electromagnetic effects: From cell biology to medicine*. Progress in Histochemistry and Cytochemistry, 43: **2009**; 177–264.

- [180] ZHAO M, PU J, FORRESTER J & MCCAIG C. *Membrane lipids, EGF receptors, and intracellular signals colocalize and are polarized in epithelial cells moving directionally in a physiological electric field*. Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 16: **2002**; 857–9.
- [181] CHAO P, LU H, HUNG C, NICOLL S & BULINSKI J. *Effects of applied DC electric field on ligament fibroblast migration and wound healing*. Connective Tissue Research, 48: **2007**; 188–197.
- [182] KLOTH L. *Electrical stimulation for wound healing: A review of evidence from in vitro studies, animal experiments, and clinical trials*. Lower Extremity Wounds, 4 (1): **2005**; 23–44.
- [183] COLE M, VOELCKER N, THISSEN H & GRIESSER H. *Stimuli-responsive interfaces and systems for the control of protein surface and cell surface interactions*. Biomaterials, 30: **2009**; 1827–1850.
- [184] HUANG C, XM C & CHEN Z. *Osteocyte: The impresario in the electrical stimulation for bone fracture healing*. Medical Hypotheses, 70: **2008**; 287–290.
- [185] YOO J & KIM S. *The effects of micro direct current electric stimulation on the enhancement of bone density and osseointegration*. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 26(S1): **1997**; 139 – 139.
- [186] SHAYESTEH Y, ESLAMI B, DEHGHAN M, VAZIRI H, ALIKHASSI A M ANDMANGOLI & KHOJASTEH A. *The effect of a constant electrical field on osseointegration after immediate implantation in dog mandibles: A Preliminary Study*. Journal of Prosthodontics, 16 (5): **2007**; 337–342.
- [187] HOFFMAN J. *Numerical Methods for Engineers and Scientists*. Marcel Dekker Inc, New York: **2001**.
- [188] HIBBIT, KARLSSON & INC S. *Abaqus User Guide V. 6.6*. HKS Inc., Pawtucket, RI, USA: **2004**.
- [189] BRENNAN M, SHARIFF G, LOUISE M, FOX P & LOCKHART P. *Relationship between bleeding time test and postextraction bleeding in a healthy control population*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics, 94: **2002**; 439–43.
- [190] BOUCHARD B, BUTENAS S, MANN K & TRACY P. *Interactions etween Platelets and the Coagulation System*. En: *Platelets*, (ed.) MICHELSON A. Elsevier: **2007**, págs. 377–402.
- [191] OLSEN L, SHERRATT J & MAINI P. *A mechanochemical model for adult dermal wound contraction and the permanence of the contracted tissue displacement profile*. Journal of Theoretical Biology, 177: **1995**; 113–128.
- [192] FROESCH E, SCHMID C, SCHWANDER J & ZAPF J. *Actions of insulin-like growth factors*. Annual Review of Physiology, 47: **1985**; 443–467.
- [193] WIESTNER M, ROHDE H, HELLE O, KRIEG T, TIMPL R & MÜLLER P. *Low rate of procollagen conversion in dermatosparactic sheep fibroblastin paralleled by increased synthesis of type I and type III collagens*. Journal of the European Molecular Biology Organization, 1(4): **1982**; 513–516.
- [194] MCANULTY R, CAMPA J, CAMBREY A & LAURENT G. *The effect of transforming growth factor- $\beta$  on rates of procollagen synthesis and degradation in vitro*. Biochimica et Biophysica Acta, 1091: **1991**; 231–235.
- [195] HENRY F & NESTLER M. *A physical model for fibrous network and its application to the shear modulus and other data of the fibrin gel*. Biphysical Chemistry, 112: **2004**; 181–185.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [196] ANDREEV V & BURLAKOVA T. *Measurements of shear elasticity and viscosity of rubberlike materials.* Acoustical Physics, 53(1): **2007**; 44–47.